

Prozessentwicklung zur Produktion von Erythropoietin mit Fibrosarcomzellen

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
Dissertation

von
Kathrin Baumeister
aus Krefeld

1. Referent: apl. Professor Dr. Jürgen Bode
2. Referent: apl. Professor Dr. Siegmund Lang
eingereicht am: 01.12.2006
mündliche Prüfung (Disputation) am: 01.03.2007
Druckjahr 2007

Dank

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 1.5.2001 bis zum 31.12.2003 bei der Fa. Aventis Pharma Deutschland GmbH durchgeführt. Stellvertretend für Aventis möchte ich Dr. Andreas Stärk dafür danken, dass ich diese Arbeit in der Abteilung Prozessentwicklung Biotechnologie anfertigen konnte. Ihm persönlich danke ich für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Norbert Schulze für seine Betreuung dieser Arbeit. Durch seine interessanten Ideen und seinen Einsatz für das Projekt und diese Arbeit hat er wesentlich zu deren Gelingen beigetragen.

Dr. Harald Conradt möchte ich für die wissenschaftliche Begleitung dieser Arbeit, für seine ständige Diskussionsbereitschaft und die Zeit, in der ich in seinen Laboren lernen und arbeiten konnte, herzlich danken.

Vielen Dank möchte ich Dr. Ulrich Valley aussprechen, der diese Arbeit mit initiiert und sie in den ersten Monaten bei Aventis begleitet hat.

Ich danke dem gesamten Marburg-Team für das ausgesprochen gute Arbeitsklima und ganz besonders Willi Beltz für seine Einführung in die Kultivierung der GA-EPO Zelllinie. Dr. Klaus Scharfenberg danke ich für viele Diskussionen und technische Ratschläge.

Dr. Eckhart Grabenhorst danke ich für die Klonierung der chimären Glycosyltransferasen, die Vorbereitung des *Glycosylation Engineerings* und seine Diskussionsbereitschaft. Elena Chichinski-Heil und Susanne Pohl danke ich für die praktische Einführung in die Glycananalytik.

Auch dem Frankfurter Zellkultur-Team möchte ich für das gute Arbeitsklima danken. Martin Fischbach und Anett Schmieder im USP sowie Jacqueline Schulz in der Analytik haben mit ihrem großartigen Arbeitseinsatz viel zu diesem Projekt beigetragen. Anett Schmieder war meine rechte Hand und zu jeder Sonderaufgabe bereit, dafür möchte ich ihr besonders herzlich danken. Tim Schledde spreche ich meinen Dank für seine Einsatzbereitschaft während seiner Diplomarbeit zum Perfusionsprozess aus. Edith Pop danke ich für ihren Einsatz in der Analytik am Wochenende.

Bei DI Joachim Hofmann möchte ich mich für viele Diskussionen über Proteinanalytik, die Unterstützung des Projekts durch sein Analytiklabor und eine gute Bürokameradschaft bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Gregor für sein Verständnis und seine Unterstützung.

Zusammenfassung

Erythropoetin (EPO) ist ein hoch glykosyliertes Protein, das zur Behandlung von renaler Anämie bei Dialysepatienten sowie bei induzierten Anämien eingesetzt wird, die durch Zytostatika in der Tumorthherapie entstehen können. Die Glycosylierung des EPOs, insbesondere die Antennarität und die Sialylierung der N-Glycane, sind entscheidend für die Wirksamkeit, die Effizienz und die Sicherheit dieses Wirkstoffes.

In dieser Arbeit zur Prozessentwicklung für die Produktion von EPO wurde zur Bestimmung dieser qualitätsrelevanten Parameter die native HPAEC PAD eingesetzt. Eine Vorbedingung hierfür war die erfolgreiche Etablierung einer effizienteren und schnelleren Probenvorbereitung für die Isolierung der N-Glycane, die es ermöglichte, diese Methode für das *in process monitoring* einzusetzen. Weiterhin konnte ein Qualitätsstandard etabliert werden, der eine hohe Produktqualität gewährleistet (vollständige terminale Sialylierung > 40 %).

Zu Beginn dieser Arbeit lagen zwei Produktionsprozesse für EPO mit der zu verwendenden Zelllinie HT 1080 GA-EPO vor: ein Airlift-Prozess, dessen Produkt sich bereits in der Zulassung zum Arzneimittel befand, sowie als Nachfolgeprozess der Perfusionsprozess I. Das EPO, das mit dem Perfusionsprozess I produziert wurde, war hinsichtlich der O-Glycosylierung nicht vergleichbar mit dem Produkt aus dem Airliftprozess. Die Zellkultur mit dem für den Perfusionsprozess I benutzten Medium zeigte zudem insgesamt hohe Anteile an Apoptose und an Zellaggregaten, die vergleichbar mit Shäroiden waren. Es musste somit ein neues Produktionsmedium etabliert werden, das eine einfache Handhabung der Zellkulturen sowie eine vergleichbare Glycosylierung des EPOs zum Airliftprozess gewährleistet. Medienentwicklung und -screening führten zu einem für den Produktionsprozess geeigneten Medium, CHO#6k (10 %) / DMEM F12 PDM 5.2 (90 %), das frei von tierischen Komponenten ist. Die mit diesem Medium kultivierten Zellen zeigten eine hohe Produktivität, das produzierte EPO erfüllte die Spezifikation von mindestens 40 % vollständig terminal sialylierten N-Glycanen und war hinsichtlich des *N-glycan patterns* und der Mikroheterogenität der O-Glycosylierung vergleichbar mit dem Produkt aus der Airlift-Kultivierung. Die phänotypische klonale Stabilität ist bei den Zellen aus dieser Kultivierung gegeben.

Bei dem hier vorgestellten neu entwickelten Perfusionsprozess (Perfusionsprozess II) handelt es sich um einen Perfusions/Bleeding Prozess. Der Anteil der vollständig terminal sialylierten N-Glycane des produzierten EPOs betrug über den gesamten Kultivierungszeitraum sowie während der verschiedenen Robustheitsstudien immer mehr als 40 %, so dass die anfangs gesetzte Spezifikation erfüllt war und damit der Anteil des therapeutisch nutzbaren EPOs gegenüber den in der Literatur angegebenen Prozesse signifikant größer ist.

Die Produktivität des Perfusionsprozesses II war mit ca. 79 mg / (Tag \cdot 10^{10} Zellen) erheblich höher als beim Perfusionsprozess I mit 5,8 mg / (Tag \cdot 10^{10} Zellen). Der viel höhere Anteil an vollständig terminal sialylierten N-Glycanen des EPOs im *bulk harvest* des neuen Produktionsprozesses ermöglicht zusätzlich eine sehr viel höhere Gesamtausbeute nach der Aufarbeitung. Die bisherige Ausbeute von 25 % würde wahrscheinlich auf etwa 50 % steigen.

Ein mögliches EPO der nächsten Wirkstoffgeneration könnte ein verändertes Glycanmuster aufweisen, das die Wirksamkeit oder die Effizienz des EPOs erhöht. In der hier vorgelegten Arbeit wurde die von Grabenhorst und Conradt entwickelte Technologie des *glycosylation engineerings* erstmals auf eine industrielle Zelllinie angewandt, um durch die gerichtete Lokalisation von Glycosyltransferasen eine gezielte Veränderung des Glycosylierungsmusters eines rekombinanten Proteins zu erreichen. Für ein *proof of concept* wurden BHK und HT1080 GA-EPO Zellen mit der chimären Glycosyltransferase *gnt 1-C2GnT I* transfiziert, um einen höheren Anteil von *core 2* O-Glycanstrukturen zu erhalten. Bei beiden getesteten Reporterproteinen (IL2 und EPO) konnte ein erhöhter Anteil an diesen *core 2* O-Glycanstrukturen nachgewiesen werden. Somit stellen diese Versuche die Grundlage für die Entwicklung eines EPOs der nächsten Generation dar, welches zum Beispiel durch entsprechendes *glycosylation engineerings* überwiegend pentaantennäre N-Glycane aufweisen könnte.

Abkürzungsverzeichnis

ADF	<i><u>a</u>nimal <u>d</u>erived <u>f</u>actor</i>
ATA	Aurintricarbonsäure
BH	<i><u>B</u>ulk <u>h</u>arvest</i>
BSA	Rinder-Serum-Albumin
CMP	Cytidin-5'-monophosphat
CMV	<i><u>C</u>ytomegalo <u>V</u>irus</i>
CTS-Region	Region mit cytoplasmatischer, transmembraner und <u>s</u> tem Domäne
DCU	<i><u>D</u>igital <u>C</u>ontroll <u>U</u>nit</i>
Dhfr	Dihydrofolatreductase
DS	<i><u>D</u>rug <u>S</u>ubstance</i>
DTT	Dithiothreitol
ECF	<i><u>E</u>DTA, <u>C</u>itrat, <u>F</u>errum</i>
EMA	<i>European Agency for the Evaluation of Medical Products</i>
EPO	<i><u>E</u>rythropoietin</i>
ER	<i><u>E</u>ndoplasmatisches <u>R</u>etikulum</i>
ESI-CID/TOF MS	<i><u>e</u>lectro <u>s</u>pray <u>i</u>onisation-<u>c</u>ollision <u>i</u>nduced <u>d</u>issociation / <u>t</u>ime <u>o</u>f <u>f</u>light <u>m</u>ass <u>s</u>pectrometry</i>
FDA	<i><u>F</u>ood and <u>D</u>rug <u>A</u>ministration</i>
Fuc	Fucose
GA-EPO	<i><u>G</u>enaktiviertes <u>E</u>rythropoietin</i>
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
HPAEC PAD	<i><u>h</u>igh <u>p</u>H <u>a</u>nion <u>e</u>xchange <u>c</u>hromatography with <u>p</u>ulsed <u>a</u>mperometric <u>d</u>etection</i>
huEPO	humanes EPO
ICH	<i><u>I</u>nternational <u>C</u>onference on <u>H</u>armonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>
MALDI/TOF MS	<i><u>m</u>atrix <u>a</u>ssisted <u>l</u>aser <u>d</u>esorption <u>i</u>onization / <u>t</u>ime <u>o</u>f <u>f</u>light <u>m</u>ass <u>s</u>pectrometry</i>

Man	Mannose
neo	Neomycin
NESP	<i><u>n</u>ovel <u>e</u>rythropoiesis <u>s</u>timulating <u>p</u>rotein</i>
NeuAc	N-Acetylneuraminsäure, Sialinsäure
PAT	<i><u>p</u>rocess <u>a</u>nalytical <u>t</u>echnology</i>
rER	<u>r</u> auhen <u>E</u> ndoplasmatischen <u>R</u> eticulums
rhEPO	rekombinantes humanes EPO
SDS PAGE	Natriumdodecylsulfat <u>P</u> oly <u>a</u> crylamid- <u>G</u> el- <u>E</u> lektrophorese
TFA	Trifluoressigsäure
TMP	<i><u>t</u>rans <u>m</u>embran <u>p</u>ressure</i>
TPCK	N-p-Tosyl-L-Phenylalanin-chromomethylketon
ü.N.	über Nacht
UDP	Uridin-5'-diphosphat
uEPO	EPO aus dem Urin von Patienten mit aplastischer Anämie isoliert
Upm	<u>U</u> mdrehungen <u>p</u> ro <u>M</u> inute

Zur Abkürzung der Aminosäuren wurden die in der Literatur gängigen Ein- und Dreibuchstaben-Codes genutzt. Zusätzlich wurden gängige Abkürzungen benutzt, die auch in einer Vielzahl von Lehrbüchern verwendet werden.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Biologische und medizinische Bedeutung der proteingebundenen Glycane	2
1.2	Proteinglycosylierung	4
1.2.1	Biosynthese der N-Glycane	5
1.2.2	Biosynthese der O-Glycane	8
1.2.3	Glycosyltransferasen	9
1.3	Biotechnologische Herstellung von Glycoproteinen	10
1.3.1	Einfluss der Produktionszelllinie auf die Glycosylierung	10
1.3.2	Einfluss von extrazellulären Parametern auf die Glycosylierung	12
1.3.3	Einfluss von Prozessparametern auf die Glycosylierung	12
1.4	Analytik von Glycoproteinen	13
1.5	EPO als Modellprotein	15
1.5.1	Genaktiviertes EPO (<i>GA-EPO</i>)	18
1.5.2	Produktionsprozesse für <i>GA-EPO</i> mit HT1080 Zellen	19
1.6	<i>Glycosylation Engineering</i>	20
1.7	Allgemeine Zielsetzung	20
1.8	Aufgabenstellung	23
2	Material und Methoden	24
2.1	Material	24
2.1.1	Zellen	24
2.1.2	Expressionsvektoren	25
2.1.3	Zellkulturmedien	26
2.2	Zellkultur	27
2.2.1	Cryokonservierung und Revitalisierung	27
2.2.2	Kultivierung von HT1080 (<i>GA-EPO</i>) Zellen in Spinnerflaschen	27
2.2.3	Kultivierung der adhären wachsenden BHK EPO und BHK IL2 Zellen	28
2.2.4	Kultivierung von HT1080 <i>GA-EPO</i> Zellen in Bioreaktoren	28
2.2.4.1	Kultivierung im Batch-Modus	28
2.2.4.2	Kultivierung im Perfusions-Modus	30
2.2.4.3	Perfusionsmodul	30
2.2.5	Adaption von HT1080 <i>GA-EPO</i> Zellen an andere Medien	31
2.2.6	Wachstumskurven	31
2.2.6.1	Wachstumskurven in Spinnerflaschen	31
2.2.6.2	Wachstumskurven in Bioreaktoren	31

2.2.7	Zellzählung und Vitalitätsbestimmung	32
2.2.8	Bestimmung von Medienparametern	32
2.2.8.1	Glucose- und Lactatkonzentration	32
2.2.8.2	Glutamin-, Glutamat- und Ammoniumionenkonzentration	32
2.2.9	Transfektion mit Expressionsvektoren	33
2.2.10	Subkultivierung	33
2.3	Proteinanalytik	33
2.3.1	Quantitative Proteinanalytik	33
2.3.2	Proteinfällung	34
2.3.3	SDS PAGE	34
2.3.4	Western Blot	35
2.3.5	ELISA zur Konzentrationsbestimmung von EPO	36
2.3.6	Reinigung von EPO mittels Immunaффinitätschromatographie	37
2.3.7	Zelllyse	38
2.4	Glycananalyse	38
2.4.1	Überblick über die Analytik von Glycanen	38
2.4.2	Enzymatische Freisetzung von Glycanen	39
2.4.3	Isolierung der N-Glycane	40
2.4.4	Entsalzung der N-Glycane	40
2.4.5	Desialylierung der N-Glycane	41
2.4.6	Analytische Trennung von N-Glycanen durch HPAEC PAD	41
2.4.7	MALDI/TOF MS Analyse von N-Glycanen	43
2.4.8	Tryptischer Verdau von EPO zur Analyse der O-Glycane	43
2.4.9	MALDI/TOF MS Analyse von tryptischen Peptiden	44
2.4.10	ESI/CID TOF MS Analyse von Peptiden	44
2.4.11	Sequenzieller Enzymverdau der O-Glycanstruktur von IL2	44
2.5	Berechnungen	45
2.5.1	Wachstumsgeschwindigkeit	45
2.5.2	Berechnung der hypotetischen Ladungszahl Z	45
3	Ergebnisse und Diskussion	46
3.1	Vergleichbarkeit von GA-EPO aus verschiedenen Produktionsprozessen	46
3.1.1	Bestimmung geeigneter Methoden für die Analyse der qualitätsrelevanten Parameter	46
3.1.1.1	Quantitative Bewertung des Grads der terminalen Sialylierung	49
3.1.2	Untersuchungen zur Vergleichbarkeit von Produkten aus verschiedenen Kultivierungen	53

3.1.2.1	Vergleichbarkeit der N-Glycanstrukturen aus verschiedenen Prozessen	54
3.1.2.2	Vergleichbarkeit der O-Glycanstrukturen aus verschiedenen Prozessen	57
3.2	Medienentwicklung und -screening	60
3.2.1	Vergleich von SMIF 7 mit dem neuen Standardmedium	62
3.2.2	Entwicklung des ADF freien Mediums DMEM F12 PDM5.2	66
3.2.3	Screening von Fertigmedien kommerzieller Hersteller und Medienmischungen	72
3.2.4	Untersuchung des Kultivierungsverhaltens von HT1080 GA-EPO Zellen in Spinnerkulturen	76
3.2.5	Kultivierung im 2 l Bioreaktor	83
3.2.6	Langzeitstabilität	94
3.3	Entwicklung eines robusten Produktionsprozesses	97
3.3.1	Produktion von GA-EPO mit einem Batch Prozess	98
3.3.2	Produktion von GA-EPO mit einem <i>repeated</i> Batch Prozess	100
3.3.3	Produktion von GA-EPO mit einem Perfusionsprozess	102
3.3.3.1	Schnellmethode zur Probenvorbereitung für die Bestimmung der qualitätsrelevanten Parameter	102
3.3.3.2	Das Perfusionsmodul	104
3.3.3.3	<i>Proof of concept</i> der Perfusionsstrategie	105
3.3.3.4	Robustheit des Prozesses unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen	112
	Erhöhter Transmembrandruck	112
	Kultivierung bei erhöhter Medienausnutzung	115
	Steigerung der Ausbeute durch Langzeitkultivierung	121
	Steigerung der Ausbeute durch Kultivierung bei erhöhter Zellkonzentration	122
3.3.3.5	Mikroheterogenität der O-Glycanstrukturen aus dem Perfusionsprozess II	124
3.3.4	Vergleich der verschiedenen Produktionsprozesse	126
3.3.4.1	Vergleich von Perfusionsprozess I und II	128
3.4	<i>Glycosylation Engineering</i> an der O-Glycosylierung	130
3.4.1	Ausblick: <i>Glycosylation Engineering</i> zur Produktion eines EPOs der nächsten Generation	142
4	Literaturverzeichnis	147

1 Einleitung

In der Medizin werden neben den chemisch synthetisierten Molekülen zunehmend Proteine als Medikamente eingesetzt. Bis zur Etablierung gentechnischer Methoden konnten therapeutisch relevante Proteine nur aus natürlichen Quellen gewonnen werden oder waren gar nicht verfügbar. Dazu gehören z. B. Erythropoietin (EPO), Gewebs-Plasminogenaktivator (*tissue plasminogen activator*, t-PA) und Faktor VIII. Derzeit werden weltweit mit über 500 biopharmazeutischen Produkten klinische Studien durchgeführt, bis zum Jahr 2003 gab es 30 lizenzierte Produkte aus Säugetierzellen (Walsh 2003; Lotan and Irimura 1987; Pavlou 2003; Molowa 2003). Der globale Marktwert für rekombinant hergestellte Medikamente stieg von 1,2 Mrd. US\$ im Jahr 1985 auf 12 Mrd. US\$ im Jahr 2000 (Walsh 2000).

Die Anwendung von Proteinen als Therapeutika setzt eine hohe Proteinqualität voraus. Bei der Mehrzahl der therapeutischen Proteine handelt es sich um sekretorische Proteine, die einer Vielzahl an co- und posttranslationalen Modifikationen unterliegen. Dazu gehören Glycosylierung, Amidierung, Acetylierung und Phosphorylierung. Der Proteinglycosylierung kommt dabei eine besondere Bedeutung zu, da Glycanstrukturen die physikochemischen sowie pharmakokinetischen Eigenschaften von Glycoproteinen stark beeinflussen sowie Immunreaktionen induzieren können (Cumming 1991a). Die terminale Sialylierung der Glycanstrukturen ist dabei für viele Therapeutika, wie z. B. EPO, besonders wichtig, da sie der entscheidende Parameter für die Halbwertszeit des Therapeutikums im Serum ist.

Für die biologische Sicherheit eines therapeutischen Proteins ist es zudem unerlässlich, dass es ein hohes Maß an Authentizität zu der natürlichen, humanen Form aufweist. Bakterien, Pilze, Insekten- und Pflanzenzellen sind nicht zur Synthese komplexer, humanähnlicher Glycanstrukturen befähigt (Grabenhorst *et al.* 1993; Jenkins *et al.* 1996; Conradt *et al.* 1987). Daher müssen für die industrielle Produktion von Glycoproteinen Säugerzellen benutzt werden, deren Kultivierung aufwändig und kostenintensiv ist. Säugetierzellen synthetisieren die Glycane der Proteine im proteinsekretorischen Stoffwechselapparat (ER und Golgi) sukzessiv über komplexe Einzelschritte, die von vielen Faktoren beeinflusst werden können. Oft liegt eine starke

Mikroheterogenität vor. Bei der Produktion von Proteinen wie EPO oder t-PA für die Anwendung als Therapeutikum werden die verwendbaren, d. h. die hoch sialylierten Proteine aus der Gesamtproduktion isoliert. Ein geringer Anteil dieser Fraktion führt zu erheblichen Ausbeuteverlusten und Kosten, so dass ein Produktionsprozess angestrebt wird, der Proteine mit einem hohen Anteil vollständig terminal sialylierter Glycane gewährleistet.

Bei der Optimierung von Produktionsprozessen muss deshalb zusätzlich zu einer hohen Produktausbeute auch eine hohe Produktqualität angestrebt werden. Um die Wirksamkeit der aufwändig produzierten Glycoproteine schon während der Prozessentwicklung und auch im Verlauf des Herstellungsprozesses abschätzen zu können, ist es für eine moderne Prozessentwicklung notwendig, die Produktanalytik prozessbegleitend zu integrieren.

Ein therapeutisches Glycoprotein, das eine über das natürliche Protein hinausgehende Wirksamkeit aufweist, kann durch die gezielte Veränderung der Glycanstrukturen, beispielsweise mittels eines *glycosylation engineering* der Produktionszelllinie, hergestellt werden. Dabei muss jedoch bekannt sein, welche Glycanstrukturen die Wirksamkeit erhöhen und ob die Sicherheit des Therapeutikums mit dieser Änderung gewährleistet ist.

Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung eines Produktionsverfahrens für die Herstellung eines Glycoproteins sowie ein *proof of concept* eines *glycosylation engineering*.

1.1 Biologische und medizinische Bedeutung der proteingebundenen Glycane

Die Oligosaccharidstrukturen von Glycoproteinen sind in eine Vielzahl von biologischen Prozessen involviert und beeinflussen die physikochemischen und pharmakokinetischen Eigenschaften dieser Proteine. Eine Beteiligung der Glycane an den diversen Funktionen, wie das Mitwirken an der Initiation der Proteinfaltung, der Stabilisierung der Konformation, der Protektion vor Proteasen, der Erhöhung der Löslichkeit, der Qualitätskontrolle neu synthetisierter Glycoproteine im ER, der Schaffung und Maskierung antigener Epitope, der Vermittlung von intrazellulären Wechselwirkungen, der Erkennung

und Bindung von Viren, Bakterien und anderer pathogener Organismen sowie der Regulierung der Halbwertszeit von Serumproteinen wurden nachgewiesen (Cumming 1991a; Varki 1993; Fiedler and Simons 1995; Rasmussen and Toftlund 1986).

Manchen Strukturmotiven kann eine eindeutige Funktion zugeordnet werden. Beispiele dafür sind der Transport lysosomaler Enzyme aus dem trans-Golgi in die Lysosomen (*targeting*) (Kornfeld and Kornfeld 1985), die Ligand-Rezeptor-Interaktion bei der Infektion von Wirtszellen durch Influenza-Viren (Weis *et al.* 1988) und die Entfernung von Proteinen mit sulfatierten GalNAc-Resten aus dem Kreislauf durch Rezeptoren von Kupffer- und Endothelzellen in der Leber (Drickamer 1991). Eine sehr wichtige Struktur-Funktions-Korrelation von therapeutischen Proteinen ist die Regulation der Halbwertszeit bei Serumproteinen durch die Besetzung der Glycanstrukturen mit terminal gebundenen Sialinsäuren. Fehlen diese, wird, wie in Abbildung 1.1 auf Seite 4 gezeigt, die nun terminal gebundene Galactose zu einem entscheidenden Strukturmotiv. Desialylierte Glycoproteine, die terminal Gal- oder GalNAc-Reste exponieren, werden nach Bindung an Asialoglycoproteinrezeptoren von Hepatozyten internalisiert und dem Kreislauf entzogen (Ashwell and Harford 1982). Durch Desialylierung sinkt z. B. die *in vivo* Halbwertszeit des humanen Ceruloplasmin von 56 h auf wenige Minuten ab (Ashwell and Morell 1974). Bei der biotechnologischen Produktion vieler Glycoproteine für therapeutische Anwendungen wird daher ein hoher Anteil an vollständig terminal sialylierten Glycanen angestrebt, da eine lange biologische Aktivität erwünscht ist und eine möglichst geringe Proteinmenge appliziert werden soll. Dies führt zu einer Reduktion der Risiken, die aus einer potentiellen Antigenität resultieren sowie zu einer Senkung der Kosten.

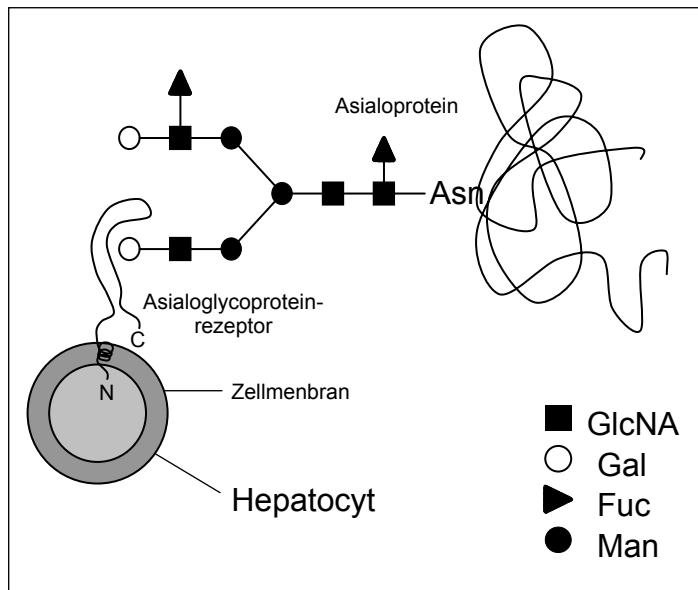


Abbildung 1.1:
Entfernung von
Asialoglycoproteinen aus
dem Blutkreislauf durch
den Asialoglycoprotein-
rezeptor eines Hepato-
cyten. (Conradt 1996)

1.2 Proteinglycosylierung

Zu Beginn der Biosynthese der Glycanstrukturen werden Oligosaccharide kovalent mit Aminosäuren des Polypeptides verknüpft. Im Wesentlichen werden dabei zwei Arten der Proteinglycosylierung aufgrund ihres Bindungstyps, ihrer Synthese und der resultierenden Oligosaccharidstruktur unterschieden: die N-Glycosylierung basiert auf einer β -N-glycosydischen Bindung zwischen der Oligosaccharid-Vorläuferstruktur und dem Amidstickstoff der Seitenkette von Asparagin (Asn), während bei der O-Glycosylierung eine α -O-glycosidische Bindung zwischen dem N-Acetylglucosamin-Monosaccharid und der Hydroxylgruppe einer Serin- oder Threoninseitenkette gebildet wird. Im Verlauf der Biosynthese der Glycane werden die durch Bindung an die Nucleotide UDP, GDP und CMP bzw. das Phospholipid Dolicholphosphat aktivierten Monosaccharide unter Spaltung einer energiereichen Bindung durch spezifische Glycosyltransferasen auf die wachsende Oligosaccharidstruktur transferiert. In Abbildung 1.2 sind Modellstrukturen der drei möglichen resultierenden N-Glycan sowie die O-Glycan Hauptgruppen abgebildet, der *high mannose-type*, der *hybrid-type*, der *complex-type* sowie der *mucin-type*.

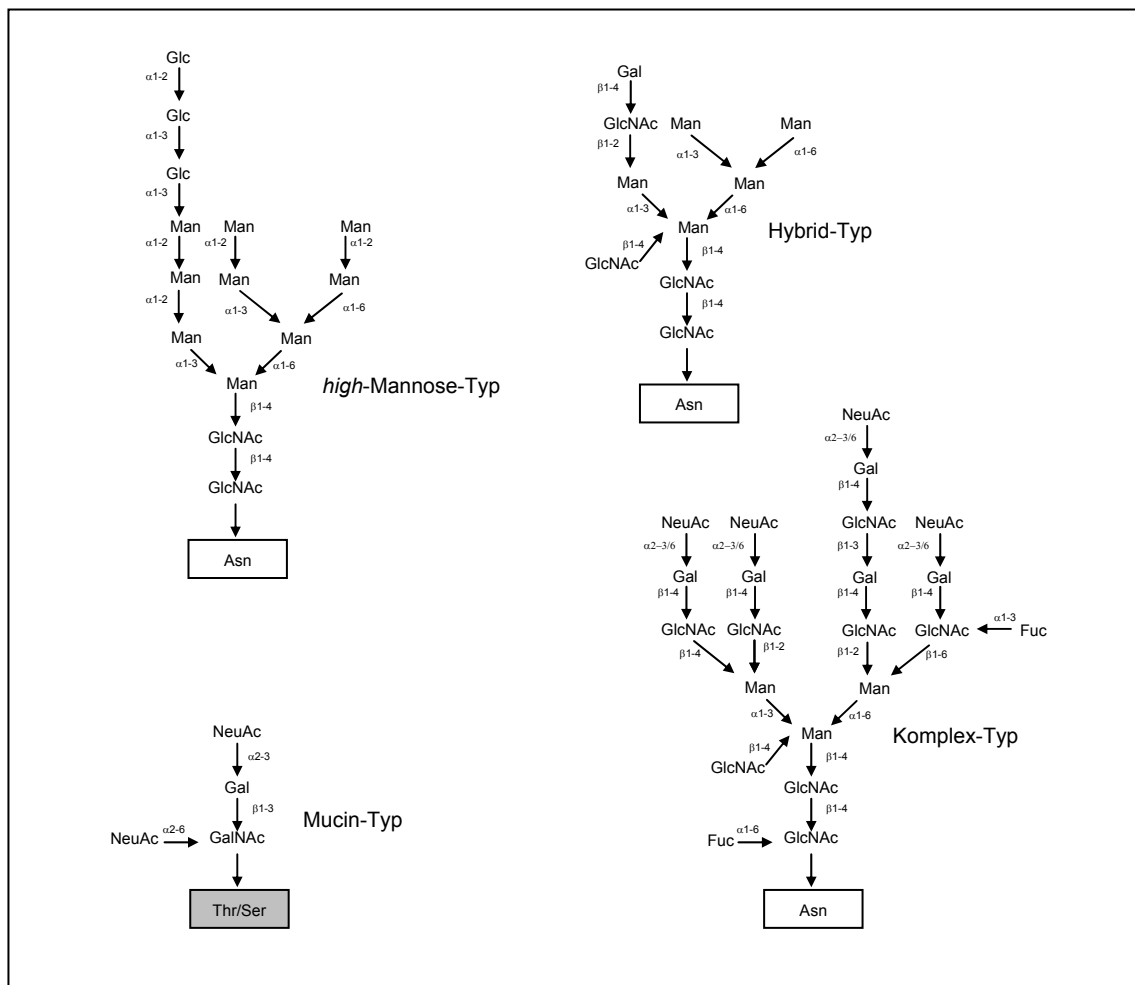


Abbildung 1.2: Schematische Abbildung der Hauptstrukturen der Oligosaccharide von Glycoproteinen aus Säugetierzellen. (Conradt 1996)

Alle N-Glycanstrukturen weisen ein $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ Pentasaccharid als *common core* auf. Darüber hinaus findet man bei *high-mannose-type*-Strukturen ausschließlich und bei *complex-type*-Strukturen keine Mannosen. *Hybrid-type*-Glycane stellen eine Mischform dar.

1.2.1 Biosynthese der N-Glycane

Die Biosynthese der N-Glycane beginnt mit der Bildung einer $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ Grundstruktur durch sukzessive Übertragung von aktivierten Monosacchariden auf einen in der Membran des rauen Endoplasmatischen Reticulums (*rER*) lokalisierten Dolicholphosphat-Carrier (Abeijon and Hirschberg 1992; Hirschberg and Snider 1987). Die vollständige $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ Grundstruktur wird co-translational *en bloc* auf den Asparaginrest der Akzeptorsequenz Asn-

Xaa-Ser/Thr einer neu synthetisierten Polypeptidkette transferiert. Diese Reaktion wird durch die membrangebundene Oligosaccharyl-Transferase katalysiert (Kaplan *et al.* 1987). Das Aminosäuretriplett Xaa steht für jede Aminosäure außer Prolin, da sie sterisch behindert wirkt (Bause 1983).

Während der Reifung des Proteins im proteinsekretorischen Stoffwechselapparat erfolgen Modifikationen des transferierten Oligosaccharides (Kobata 1992; Kornfeld and Kornfeld 1985), bei denen zunächst einige Monosaccharide abgespalten (*trimming*) und andere anschließend neu hinzugefügt (*processing*) werden. Dabei sind die aktivierten Nucleotidzucker Donorsubstrate. Aufgrund der Relevanz für die Arbeit wird hier die Bildung von *complex-type* Glycanen beschrieben. Abbildung 1.3 auf Seite 7 zeigt die Biosynthese eines komplexen diantennären N-Glycans.

Die Modifikation des *en bloc* transferierten N-Glycosid Vorläufermoleküls (*Schritt 1*) wird im rER durch die Abspaltung der terminalen Glucose durch die α 1,2-Glucosidase I initiiert (*Schritt 2*). Die α 1,3-Glucosidase II setzt die beiden inneren Glucosereste frei (*Schritt 3*). Oft wird daneben bereits im rER ein α 1,2-gebundener Mannoserest abgespalten (*Schritt 4*). Im Golgi entfernt dann die α -Mannosidase I alle verbleibenden Mannosereste in α 1,2-Bindung (*Schritt 5*), wodurch die GlcNAc Transferase I die GlcNAc in β 1,2-Bindung auf die α 1,3-gebundene äußere *core* Mannose überträgt (*Schritt 6*). Die α -Mannosidase II spaltet zwei weitere Mannosereste ab (*Schritt 7*). Die nun entstandene Glycanstruktur stellt das Schlüsselintermediat zur Bildung von *complex-type* Glycanen dar. Es folgt der Transfer eines GlcNAc Monosaccharides in β 1,2-Bindung auf die α 1,6-gebundene äußere *core* Mannose durch die GlcNAc-Transferase II (*Schritt 8*). Mit dieser Reaktion ist die Bildung eines *complex-type* Glycans eingeleitet. Eine Galactosyltransferase bindet im Anschluss Galactose in z. B. β 1,4-Stellung an die terminalen, in β 1,2-Stellung gebundenen GlcNAc-Reste (*Schritt 10*). Spezifische Sialyltransferasen können nun N-Acetylneuraminsäure (*eine Sialinsäure*) in α 2,3- oder α 2,6-Bindung auf die Galactosereste übertragen (*Schritt 11*).

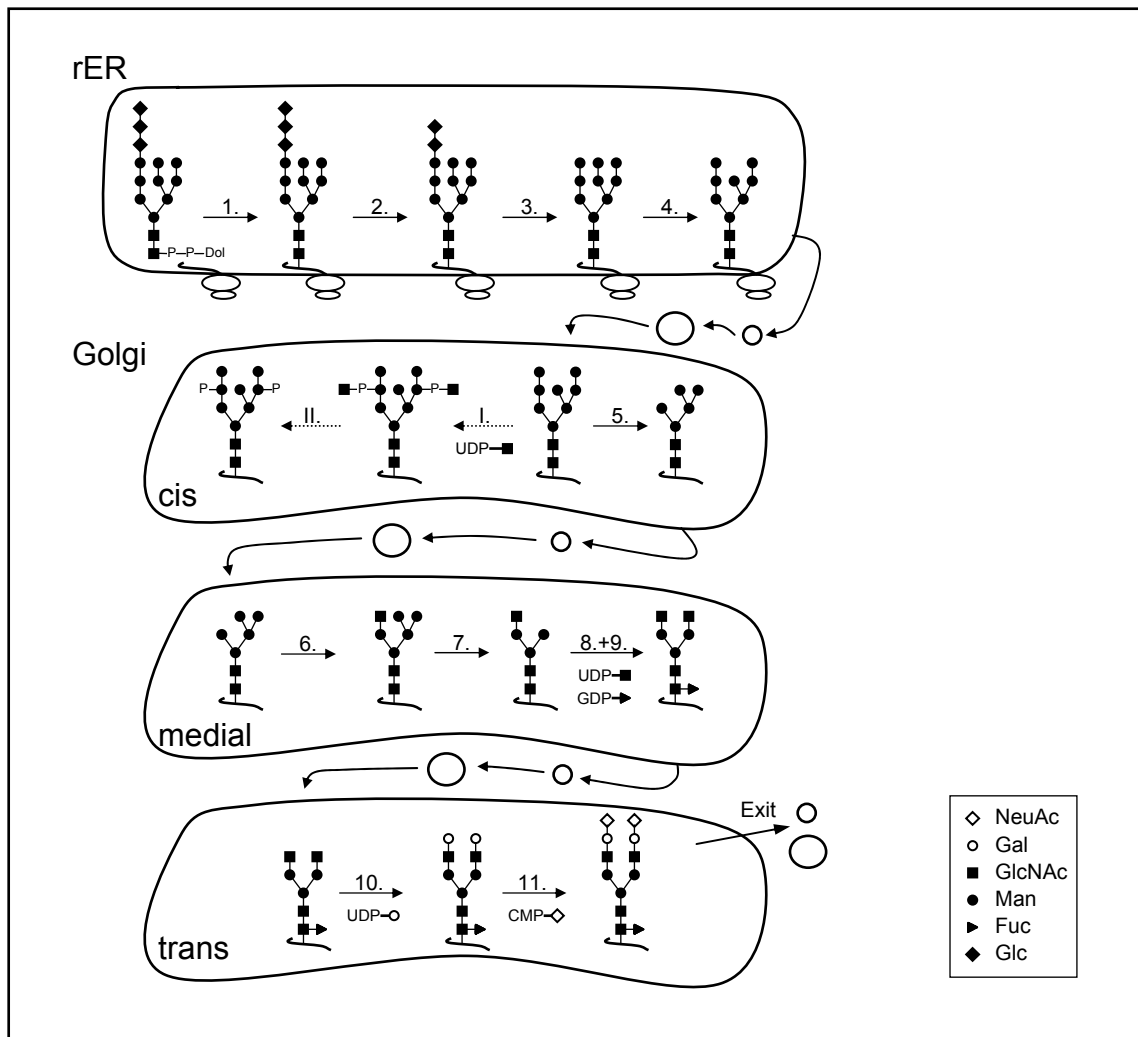


Abbildung 1.3: Vereinfachte, schematische Darstellung der Biosynthese N-glycosidisch gebundener *complex-type* Oligosaccharide.

1. Oligosaccharyltransferase, 2. α -Glucosidase I, 3. α -Glucosidase II, 4. ER α 1,2-Mannosidase, I. N1-Acetylglucosaminidase, II. N-Acetylglucosamin-1-phosphodiester α -N-Acetylglucosaminidase, 5. Golgi- α 1,2-Mannosidase, 6. GlcNAc-Transferase I, 7. Golgi- α -Mannosidase, 8. GlcNAc-Transferase II, 9. α 1,6-Fucosyltransferase, 10. β 1,4-Galactosyltransferase, 11. α 2,3- oder α 2,6-Sialyltransferase (aus Kornfeld and Kornfeld, 1985).

Tri- bzw. tetraantennären Glycane werden durch den Transfer weiterer GlcNAc Reste an die äußeren *common core* Mannosen durch die GlcNAc-Transferasen IV bzw. V gebildet. Des Weiteren sind die Bildung von *bisecting* N-Glycanen (*GlcNAc in β 1,4-Stellung an der inneren common core Mannose*), von Repeat-Strukturen (z. B. *Gal β 1-4GlcNAc*) sowie die Addition von peripheren und proximalen Fucosen möglich. Durch Übertragung zusätzlicher Monosaccharide, Phosphorylierungen von Mannoseresten und Sulfatierung von Mannose- und

N-Acetylhexosaminresten können weitere Modifikationen stattfinden (Kornfeld and Kornfeld 1985).

1.2.2 Biosynthese der O-Glycane

Abweichend von der N-Glycosylierung wird bei der Biosynthese von O-Glycanen kein Lipid-gebundenes Vorläuferoligosaccharid gebildet. Die aktivierten Monosaccharide werden sequentiell durch die Aktivität spezifischer Glycosyltransferasen, beginnend mit dem Transfer eines UDP-aktivierten N-Acetylgalactosamin (*GalNAc*) Restes auf einen Serin- oder Threoninrest direkt transferiert. Eine Konsensussequenz, die die Substratspezifität der *GalNAc*-Transferase determiniert, konnte bisher nicht definiert werden. Aus der Lokalisation der *GalNAc*-Transferase im Golgi kann geschlossen werden, dass die Initiation am vollständig gefalteten Protein stattfindet (Roth *et al.* 1994).

Im Gegensatz zur einheitlichen *core* Struktur der N-Glycane lassen sich bei den O-Glycanen mindestens sechs verschiedene *core* Strukturen unterscheiden. Die Biosynthesen der für diese Arbeit relevanten *core 1* und *core 2* Strukturen sind in Abbildung 1.4 dargestellt.

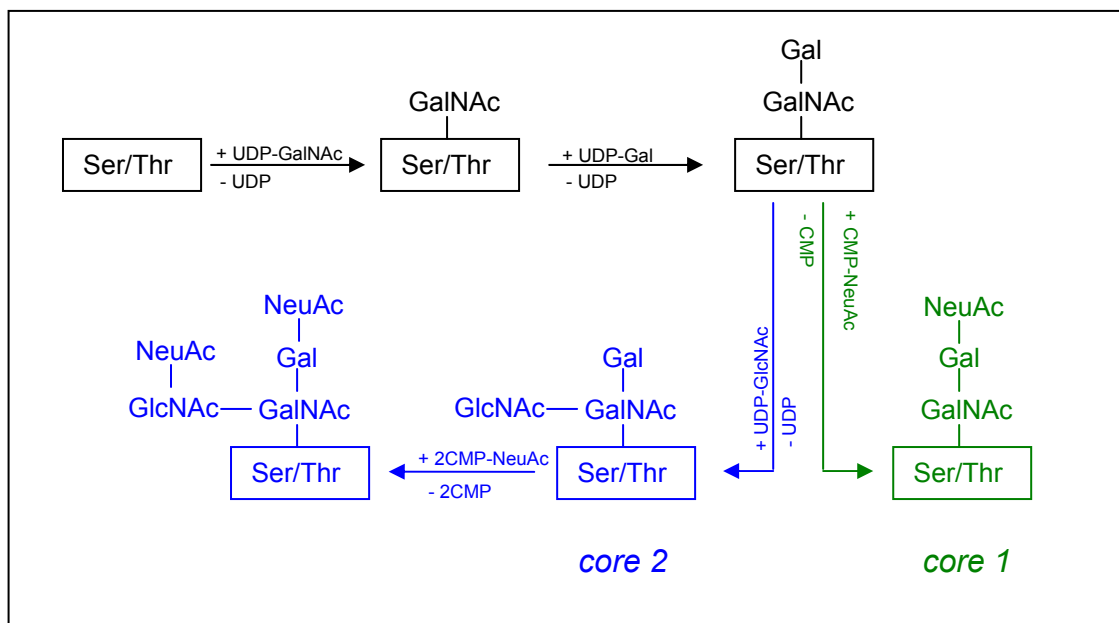


Abbildung 1.4: Vereinfachte, schematische Darstellung der Biosynthese von *core 1* und *core 2* O-Glycanstrukturen.

Die in den O-Glycanen von Serumproteinen am häufigsten vorkommende *mu*cin-type *core 1* Struktur wird durch den Transfer eines Galactose-Restes in β 1,3-Bindung auf den proteingebundenen *GalNAc*-Rest gebildet.

Sialyltransferasen binden anschließend Sialinsäuren in $\alpha 2,3$ - bzw. $\alpha 2,6$ -Stellung an die Galactose oder auch in $\alpha 2,6$ -Bindung an das proteingebundene GalNAc. Eine *core 2* Struktur wird durch den Transfer einer GlcNAc Struktur in $\beta 1,6$ -Bindung an das proteingebundene GalNAc initiiert. Darauf folgt die Bindung einer Galactose in $\beta 1,4$ -Stellung. Sowohl der Galactose-Rest wie auch der GlcNAc-Rest können sialyliert werden. Bei der Bildung des *core 1* bzw. der *core 2* O-Glycanmusters stehen die Sialyltransferase (*eine $\alpha 2,3$ NeuAc Transferase*), die eine Neuraminsäure auf die Galactose transferiert, mit der *core 2*-GlcNAc-Transferase in Konkurrenz. Wurde zuerst die Neuraminsäure übertragen, ist die Glycanstruktur kein Akzeptor mehr für die *core 2*-GlcNAc-Transferase, es entsteht eine *core 1* O-Glycanstruktur. (Schachter and Brockhausen 1989)

Im Vergleich zur N-Glycosylierung werden bei der O-Glycosylierung Oligosaccharide mit einer deutlich geringeren Komplexität gebildet (Van den Steen P. *et al.* 1998; Sadler 1984; Rudd and Dwek 1997).

1.2.3 Glycosyltransferasen

Der Transfer von aktivierten Monosacchariden auf eine Glycanstruktur wird durch spezifische Glycosyltransferasen katalysiert, die residente Transmembranproteine des Golgi-Apparates sind. Hinsichtlich ihres Donor- und Akzeptorsubstrates weisen sie eine ausgeprägte Spezifität auf. Vermutlich sind mehr als 100 verschiedene Glycosyltransferasen erforderlich, um alle bisher bekannten Glycoprotein- und Glycolipidstrukturen zu bilden. Die bisher analysierten Glycosyltransferasen lassen eine ähnliche Domänenstruktur und Topologie erkennen, die jedoch nicht auf Sequenzhomologien zurückzuführen sind (Paulson and Colley 1989; Colley 1997). Die Glycosyltransferasen mit bekannter Primärsequenz gehören ausschließlich zu den Typ II Transmembranproteinen. Dabei ist die carboxyterminale katalytische Domäne der Enzyme im Lumen des Golgi Apparates lokalisiert und über die proteolytisch sensitive *stem* Region mit der Transmembransequenz verbunden, an die sich der aminoterminal cytosolische Abschnitt. Die cytosolische-, die transmembrane- und die stem-Region (*zusammengefasst CTS-Region*) sind

nach den Untersuchungen von Grabenhorst & Conradt für die Lokalisation der Glycosyltransferasen im Golgi verantwortlich (Grabenhorst *et al.* 1999).

1.3 Biotechnologische Herstellung von Glycoproteinen

Glycoproteine weisen speziesspezifische, zellspezifische, gewebespezifische, differenzierungsspezifische sowie polypeptidspezifische Glycosylierungsmuster auf (Kobata 1992; Goochee *et al.* 1991; Conradt *et al.* 1987; Rademacher *et al.* 1988). Darüber hinaus zeigen sie eine beträchtliche Mikroheterogenität in der Glycosylierung, die auf den physiologischen Response der Zellen auf ihre Kultivierungsumgebung zurückzuführen ist. Glycoproteine bestehen somit aus einem Gemisch von Proteinen mit unterschiedlichen Glycoformen. Dabei können sowohl die verschiedenen Glycosylierungsstellen innerhalb eines Proteins als auch die spezifischen Glycosylierungsstellen unterschiedliche Oligosaccharidstrukturen aufweisen (*site heterogeneity*). Die Glycoformen eines Proteins können sich in ihren physikochemischen und biochemischen Eigenschaften unterscheiden und so zu einer funktionellen Diversität der Glycoproteine beitragen (Rademacher *et al.* 1988). Bei der Prozessentwicklung für die biotechnologische Produktion von Glycoproteinen müssen daher sowohl die Produktionszelllinie sorgfältig ausgewählt als auch extrazelluläre Faktoren wie das Kultivierungsmedium, physikochemische Parameter und die Kultivierungsstrategie optimiert werden, um die gewünschten, definierten Glycanstrukturen zu erhalten (Goochee and Monica 1990; Jenkins and Curling 1994; Kanazawa *et al.* 1999). Unerlässlich ist außerdem die passende Produktanalytik (Wolf 1984).

1.3.1 Einfluss der Produktionszelllinie auf die Glycosylierung

Aufgrund der spezie- und zellspezifischen Glycosylierung von Proteinen muss bei der Produktion eines Glycoproteins für die Anwendung als Therapeutikum die Produktionszelllinien ausgewählt werden, die die größtmögliche Authentizität der Glycanstrukturen zu den natürlichen humanen Formen synthetisiert und sich gleichzeitig als Produktionszelllinie eignet. Tabelle 1.1 zeigt die detektierten N-Glycanmotive von rekombinanten Glycoproteinen, die mit verschiedenen Zellen produziert wurden.

Tabelle 1.1: N-Glycanmotive rekombinanter Proteine nach Expression in verschiedenen Wirtszellen.*

Glycan Struktur	BHK	CHO	Ltk ⁻	C127
proximale Fucose	+	+	+	+
Fuc α 1-2Gal-R	+	+	?	?
α 2-6NeuAc	-	-	+	+
α 2-3NeuAc	+	+	+	+
NeuGly	+/-	+	+	+
tri/tetraantennär	+	+	+	+
Lactosamin <i>repeats</i>	+	+	+	+
Gal β 1-3GlcNAc	+	-	-	-
sulfatierte Glycane	?	+	+	+
Gal β 1-3Gal	-	+	+	+
Mannose-6-Phosphat	+	+	?	?
<i>Bisecting</i> GlcNAc	-	-	+	+
GalNAc β 1-4GlcNAc	+	-	-	-
Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc	-	-	+	+

*basierend auf Strukturanalysen von IFN- β , EPO, ATIII, IL6, N-Glycosylierungsmutanten von IL2, β -Trace Protein und t-PA (Conradt 1990; Galili *et al.* 1987).

Glycanstrukturen können u. a. Immunreaktionen induzieren (Cumming 1992; Cumming 1991b). Z. B. synthetisieren die murinen C127 Zellen einen beträchtlichen Anteil an α -Galactosylmotiven (*Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R*) (Galili *et al.* 1987), die bei einer humantherapeutischer Anwendung ein Sicherheitsproblem darstellt, da 1 % der humanen Serum IgG gegen dieses Epitop gerichtet ist. Murine Zellen eignen sich daher nicht als Produktionszellen für Humantherapeutika. CHO und BHK Zellen eignen sich grundsätzlich für deren Produktion, auch wenn sie nicht die humanen α 2-6 sondern α 2-3 gebundenen Neuraminsäuren synthetisieren. Die Bedeutung der α 2-6NeuAc ist nicht bekannt.

Für diese Arbeit wurde die genaktivierte, humane Fibrosarcomzelllinie HT1080 benutzt (Rasheed *et al.* 1974). Humane Zelllinien gehören nicht zu den in Produktionsprozessen häufig verwendeten Zelllinien. Im Gegensatz zu z. B. CHO-Zellen ist über das posttranslationale Potential der HT1080 Zelllinie so gut wie nichts bekannt. Es wurde eine humane Zelllinie verwendet, da vermutet wird, dass sie über das geeignete zelllinienspezifische Glycosylierungspotential für Humantherapeutika verfügt.

1.3.2 Einfluss von extrazellulären Parametern auf die Glycosylierung

Extrazelluläre Parameter können einen erheblichen Einfluss auf die Glycosylierung von Proteinen haben. Besonders die N-Glycosylierung ist, bedingt durch ihre Komplexität, anfällig gegenüber extrazellulären Einflüssen. Um die erforderliche Homogenität der Glycane während des Prozesses zu gewährleisten, ist es daher erforderlich, den Einfluss dieser Faktoren auf die Oligosaccharidstrukturen von Proteinen zu untersuchen und bei der Produktion zu berücksichtigen.

Bei verschiedenen Zelllinien wurde beispielsweise beobachtet, dass eine Glucoselimitierung im Medium sowohl die Synthese des Lipid-gebundenen Vorläufermoleküls als auch die Besetzungsfrequenz von Glycosylierungs-*sites* beeinflusst (Elbein 1987; Rearick *et al.* 1981; Davidson and Hunt 1985). Des Weiteren gibt es eine Reihe von Untersuchungen, welche einen Einfluss von Vitamin A auf die Mikroheterogenität der Glycanstruktur von Proteinen belegen (Wolf 1984; Bernard *et al.* 1984; Lotan *et al.* 1988; Lotan and Irimura 1987). Dabei wurden bei verschiedenen Zelllinien und Glycanen eine erhöhte Sialylierung der Glycane, eine effizientere *site*-spezifische Glycosylierung sowie eine erhöhter Anteil von *high mannose type* im Vergleich zu *complex type* Glycanen festgestellt. Der Einfluss von Serum auf die terminale Sialylierung eines monoklonalen Antikörpers wurde von Patel untersucht (Patel *et al.* 1992). Der unter serumfreien Bedingungen produzierte Antikörper wies einen signifikant höheren Neuraminsäuregehalt auf, als der in serumhaltigem Medium produzierte. Eine potentielle Quelle für Mikroheterogenitäten stellen die Aktivitäten von Glycosidasen dar, die die Glycoproteine extrazellulär degradieren können (Gramer and Gooch 1993).

1.3.3 Einfluss von Prozessparametern auf die Glycosylierung

Auch die Prozessparameter haben einen Einfluss auf die Proteinglycosylierung. Bei Batchkultivierungen kann der Grad der Glycosylierung über die Kultivierungszeit abnehmen (Curling *et al.* 1990). Die Arbeitsgruppen von Hayter und Nyberg zeigten, dass dies mit der Limitierung von Nährstoffen, insbesondere von Glukose und Glutamin, zusammenhängen kann (Hayter *et al.* 1992; Nyberg *et al.* 1999). Gering sialylierte Glycane oder erhöhte Anteile an Glycanen mit *branching*-Motiven können entstehen, wenn Ammonium in der

Kultur akkumuliert (Andersen and Goochee 1994; Zanghi *et al.* 1998; Yang and Butler 2000). Die Ammoniumkonzentration, bei der es zu diesen Effekten kommt, ist zelllinienabhängig. Durch eine Perfusionskultivierung können diese Effekte umgangen werden.

Nicht optimale pH Werte ($< 6,6$ und $> 8,2$) verändern ebenfalls das *glycan pattern* (Rothman *et al.* 1989; Borys *et al.* 1993). Unter geringen Sauerstoffpartialdrücken produzierte Glycane von IgG zeigten verminderte terminale Galactosylierung (Kunkel *et al.* 1998). Die Temperatur kann ebenfalls einen Einfluss auf das *glycan pattern* haben: Nabi und Dennis beobachteten eine Erhöhung von Lactosaminrepeats in die Glycane eines Proteins, das sie bei niedrigen Temperaturen produzierten (Nabi and Dennis 1998). Daher müssen in Vorversuchen der optimale pH Wert sowie die geeignete Temperatur für die Produktion von Glycoproteinen bestimmt werden.

Watson *et al.* verglichen die Glycosylierung von rhu *Tissue Kallikrein* aus CHO Zellen, welches von Microcarrier- bzw. Suspensionskulturen produziert wurde (Watson *et al.* 1994). Dabei stellten sie fest, dass das *Tissue Kallikrein* aus Microcarrier-Kulturen einen deutlich geringeren Anteil an terminal gebundener Sialinsäure aufwies. Ein Prozess mit Suspensionszellen ist damit zu favorisieren.

Da es essentiell ist, konsistente Glycanprofile in den verschiedenen Produktionsbatches zu erhalten (Restelli and Butler 2002) ist es wichtig, den Einfluss der verschiedenen Prozessparameter auf das Produkt zu kennen.

1.4 Analytik von Glycoproteinen

Zur detaillierten Charakterisierung von Glycoproteinen ist eine umfangreiche Analytik durch komplementäre Methoden notwendig. Abbildung 1.5 auf Seite 14 zeigt eine Möglichkeit der Gesamt-Glycananalyse.

Das zu analysierende Protein wird entweder einem Verdau mit N-Glycosidase unterzogen (1), bei dem die N-Glycanstrukturen abgespaltet werden oder aber einem tryptischen Verdau (2), mit dem tryptische Glycopeptide erhalten werden. Die N-Glycane aus dem N-Glycosidase F Verdau können entweder nativ (3) oder desialyliert (4) weiter analysiert werden. Bei der Analyse der nativen N-Glycane mit der HPAEC PAD (5) werden die Glycane vor allem nach ihrer

Ladung, d.h. nach ihrem Sialinsäuregehalt, und außerdem nach ihrer Konformität, d.h. nach ihrer Antennarität, getrennt. Die Auswertung erfolgt aufgrund der Retentionszeit, die mit der Retentionszeit von Standards verglichen werden. Um diese Ergebnisse zu bestätigen oder unbekannte potentielle N-Glycane zu identifizieren, werden massenspektrometrische Analysen als komplementäre Methode durchgeführt.

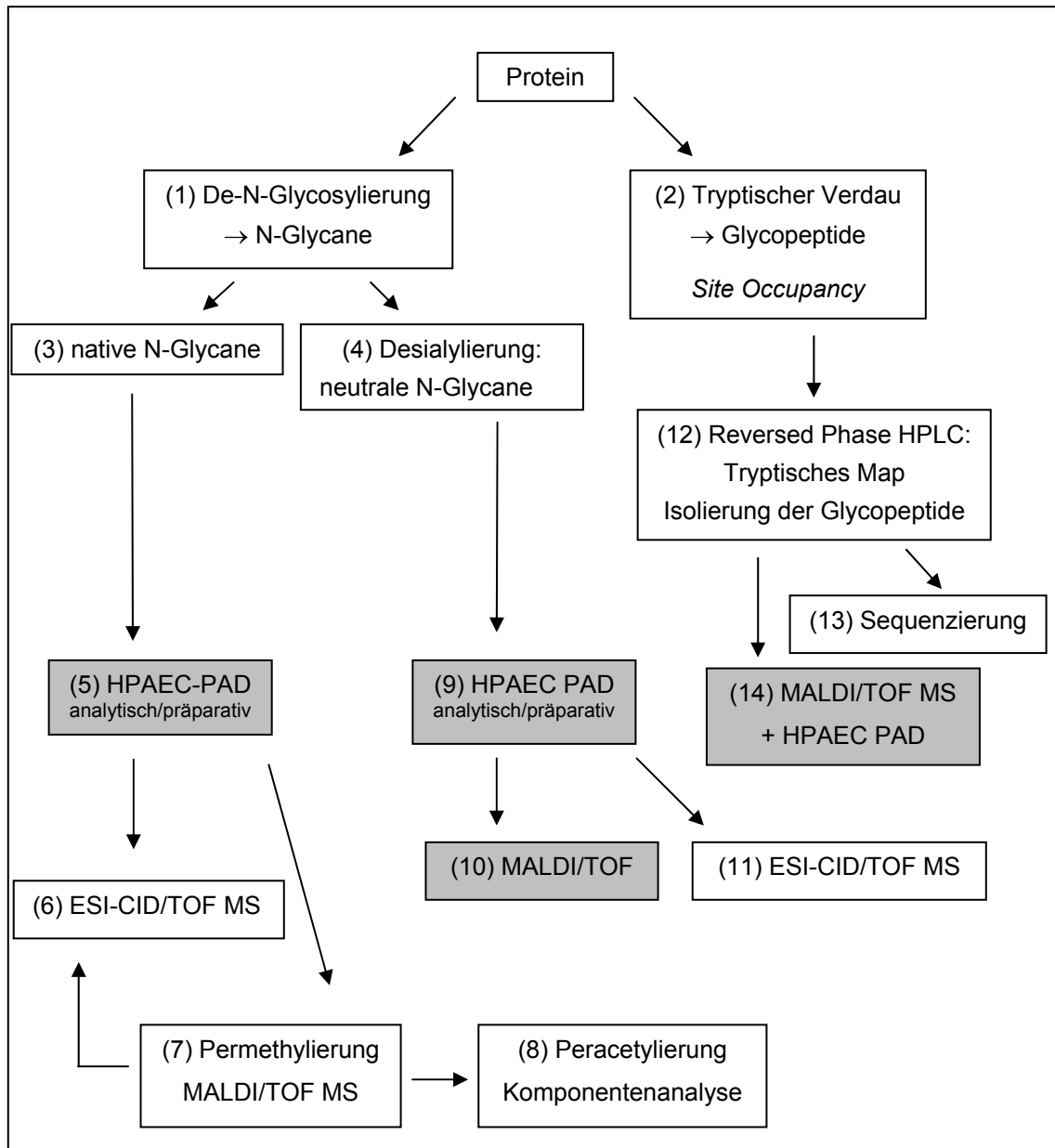


Abbildung 1.5: Schema einer Gesamt-Glycananalyse. Die grau unterlegten Analysen wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

Mit der ESI-CID/TOF MS Technik (6) erfolgt die Strukturaufklärung über Fragmentierungen der Glycanstrukturen, Permethylierung (7) vor der

MALDI/TOF MS Analyse ermöglichen eine Analyse der sialylierten, nativen N-Glycane über die Masse und eine Peracetylierung vor der Komponentenanalyse erlaubt eine Bindungsanalyse (8).

Bei der Analyse der desialylierten, also der neutralen N-Glycane mit der HPAEC PAD (9) werden die Glycane nach Struktur getrennt. Da durch die Desialylierung der Ladungszustand der einzelnen Glycane gleich ist, liefert diese Analyse genauere Auskünfte über die Antennaritäten als die HPAEC PAD Analyse mit nativen N-Glycanen. MALDI/TOF MS (10) und ESI-CID/TOF MS (11) Analysen geben wiederum Auskunft über die Struktur der N-Glycane aufgrund der gemessenen Massen.

Die einzelnen Peptide des tryptisch verdauten Proteins (12) können über eine *reversed phase* Chromatographie getrennt werden. Über die Peptide lassen sich Aussagen über die *site occupancy*, die Sequenz (13) und wiederum mittels MALDI/TOF MS (14) bzw. ESI-CID/TOF MS Aussagen über die Struktur der Glycane treffen, die an die Glycopeptide gebunden sind.

1.5 Das Modellprotein Erythropoietin

Das Glycoprotein Erythropoietin (*EPO*) wird bei Erwachsenen vor allem in der Niere synthetisiert und über das Blut ins Knochenmark transportiert. Dort stimuliert es die Proliferation und Differenzierung von erythroiden Stammzellen zu Erythroblasten (Koury and Bondurant 1992; Krantz 1991). Bisher konnten die EPO produzierenden Zellen nicht eindeutig lokalisiert werden, jedoch wurde in mehreren Studien den interstitiellen Zellen im peritubulären Kapillarbett der Niere die Produktion von EPO zugeschrieben (Fisher 1997).

Humanes EPO besteht aus 165 Aminosäuren und hat aufgrund der Heterogenität der Glycanstrukturen eine Masse von 34 bis 39 kDa (Jacobs 1985; Lin *et al.* 1985), deglycosyliertes Protein hat eine Masse von 18240 Da. Daraus ergibt sich, dass ca. 40 % des Molekulargewichtes durch den Kohlenhydratanteil bestimmt wird (Tsuda *et al.* 1990). EPO weist drei N-Glycosylierungsstellen an Asn 24, Asn 38 und Asn 83 sowie eine O-Glycosylierungsstelle an Ser 126 auf (Lin *et al.* 1985). Es ist somit einer der am stärksten glycosylierten hämatopoetischen Wachstumsfaktoren. Die

Glycanstrukturen schirmen große Teile der Proteinoberfläche ab und beeinflussen die physikochemischen Eigenschaften des Proteins stark.

Die N-Glycane des aus dem Urin von Patienten mit aplastischer Anämie isolierten EPOs (*uEPO*) wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen detailliert untersucht (Sasaki *et al.* 1987; Takeuchi *et al.* 1988; Tsuda *et al.* 1988). Neben z. T. unterschiedlichen Befunden, die auf die geringen Ausgangsmengen und die unterschiedlichen Analysemethoden zurückzuführen sind, wurden in allen Präparaten vorwiegend tetraantennäre Glycane detektiert, die zu einem hohen Prozentsatz proximal fucosyliert waren. Die Glycanstrukturen von rekombinantem humanen EPO (*rhuEPO*) nach Expression in CHO-Zellen (Sasaki *et al.* 1987; Takeuchi *et al.* 1988; Watson *et al.* 1994a Hokke *et al.* 1995) und BHK-21 Zellen (Tsuda *et al.* 1988; Nimtz *et al.* 1993) belegen ebenfalls einen hohen Anteil tetraantennärer N-Glycane. Die Antennarität kann demnach bei EPO als polypeptidspezifisch angesehen werden. Bei den unterschiedlichen Zelllinien wurden jedoch Mikroheterogenitäten festgestellt, die auf die verwendete Zelllinie, das verwendete Gewebe oder die unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen zurückzuführen sind. Die Analyse der *rhuEPO* N-Glycane der einzelnen Glycosylierungsstellen zeigte, dass der größte Anteil der di- und triantennären Strukturen an Asn 24 gebunden ist, während Asn 38 und Asn 83 fast ausschließlich durch tetraantennäre Glycane modifiziert sind (Nimtz *et al.* 1993; Sasaki *et al.* 1988).

Bei der Analyse der O-Glycane aus *uEPO* wurde eine *mucin-type core 1* Struktur detektiert, die mit einer bzw. zwei Neuraminsäuren modifiziert war (Sasaki *et al.* 1987). Ein solches Glycan wurde auch nach der Expression von *rhuEPO* in CHO- und BHK-21 Zellen nachgewiesen (Hokke *et al.* 1995; Tsuda *et al.* 1990; Nimtz *et al.* 1993; Sasaki *et al.* 1987; Sasaki *et al.* 1987).

Die Bedeutung der N-Glycane des EPOs für die *in vivo* und die *in vitro* Aktivität wurde eingehend untersucht (Takeuchi and Kobata 1991). Lowy *et al.* konnten zeigen, dass die Desialylierung des Proteins zu einem vollkommenen Verlust der *in vivo* Aktivität führt (Lowy *et al.* 1960). Fukuda *et al.* wiesen mit hochsialyliertem *rhuEPO* aus CHO-Zellen eine *in vivo* Halbwertszeit von zwei Stunden nach, während die desialylierte Form bereits sechs Minuten nach der Injektion im Blut nicht mehr nachgewiesen werden konnte (Lowy *et al.* 1960;

Fukuda *et al.* 1989b). Das desialylierte EPO reichert sich in der Leber an; die Eliminierung aus dem Blutkreislauf ist auf die Wechselwirkung mit dem Asialoglycoproteinrezeptor zurückzuführen (Spivak and Hogans 1989; Fukuda *et al.* 1989; Goldwasser *et al.* 1974).

Tsuda *et al.* zeigten eine deutlich erhöhte *in vitro* Aktivität von desialyliertem im Vergleich zu hochsialyliertem EPO (Tsuda *et al.* 1990). Sie konnten nachweisen, dass dies auf einer höheren Affinität des desialylierten EPOs zum Erythropoietinrezeptor beruht. Egrie und Browne bestätigten diese Ergebnisse (Egrie and Browne 2001). In vergleichenden Untersuchungen von sialyliertem und desialyliertem EPO konnten sie nachweisen, dass die Wechselwirkung von EPO mit dem Asialoglycoproteinrezeptor einen stärkeren Einfluss auf die *in vivo* Aktivität hat als die Affinität zum Erythropoietinrezeptor. Für die Prozessentwicklung bedeutet dies, dass der Prozess zu einem möglichst vollständig terminal sialyliertes Produkt führen sollte.

Vollständig deglycosyliert oder auch bei nur zwei unbesetzten N-Glycosylierungsstellen verliert EPO die *in vivo* Aktivität vollständig (Delorme *et al.* 1992; Tsuda *et al.* 1988; Yamaguchi *et al.* 1991). Auch scheint die Antennarität bei vorhandenen N-Glycanen eine wichtige Rolle für die pharmakokinetischen Eigenschaften des EPOs zu spielen. Takeuchi *et al.* beschrieben eine stark eingeschränkte Aktivität von rhuEPO aus einer CHO-Zelllinie, die überwiegend diantennäre N-Glycane synthetisierte. Dieses EPO wurde dreimal schneller abgebaut als tetraantennär glycosyliertes EPO, obwohl beide vergleichbar sialyliert waren (Takeuchi *et al.* 1989). Das rhuEPO mit dem hohen Anteil an diantennären N-Glycanen reicherte sich dabei in der Niere an (Misaizu *et al.* 1995). Da die Zugabe von nicht radioaktiv markiertem EPO den Anteil an radioaktiv markierten, diantennärem EPO in der Niere nicht herabsetzte, diskutierten sie, dass das diantennäre EPO nicht über einen Rezeptor in der Niere gebunden wird, sondern über einen unspezifischen Mechanismus wie der Glomerularfiltration dem Körper entzogen wird. Das geringe Molekulargewicht von EPO von ca. 34 kDa scheint kritisch für die Glomerularfiltration zu sein (Maack 1975). Da die Oligosaccharide einen großen Einfluss auf das Molekulargewicht von EPO haben, könnte die Antennarität

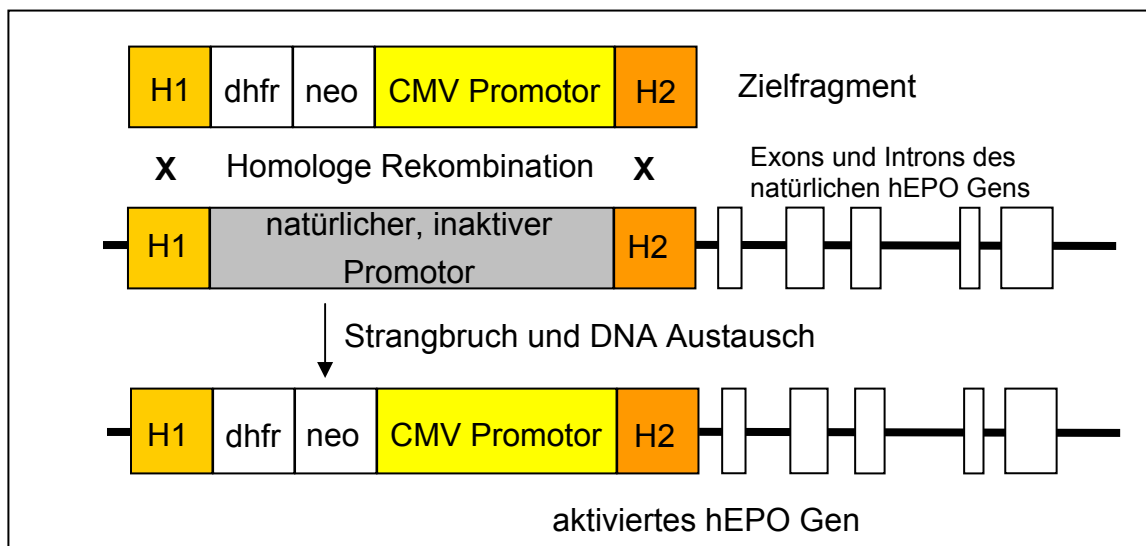
entscheidend für die Geschwindigkeit und das Maß der Glomerularfiltration sein.

Erythropoietin wird hauptsächlich zur Behandlung von renaler Anämie bei Hämodialyse- und Prädialysepatienten eingesetzt. Weitere Indikationen sind durch Zytostatika in der Tumorthherapie induzierte Anämien sowie in den USA und Kanada zugelassene Behandlung einer durch HIV-Infektion hervorgerufenen Anämie. Im Jahr 2002 wurde Erythropoietin im Wert von US\$ 8,1 Mrd. verkauft (IMS World Review 2002).

1.5.1 Genaktiviertes Erythropoietin (GA-EPO)

Für diese Arbeit wurde Erythropoietin mit dem in der humanen HT1080 Zelllinie aktivierten Erythropoietin-Gen produziert. Abbildung 1.6 zeigt den schematischen Ablauf der homologen Rekombination bei der der natürliche, inaktive Promotor durch einen CMV-Promotor ersetzt wurde (WO 94/12650). Es wurde ein aktives hEPO-Gen erzeugt.

Durch die Aktivierung des EPO-Gens der HT1080 Zellen sollte es möglich sein, EPO mit einer sehr großen Authentizität zum natürlich vorkommenden, huEPO zu produzieren.



dhfr: Gen der Dihydrofolatreduktase (*Mechanismus der Amplifikation*)

neo: Gen für die Neomycin Phosphotransferase (*Mechanismus der Selektion*)

CMV Promotor: Cytomegalo Virus Promotor

H1, H2: homologe Sequenzen

Abbildung 1.6: Schematischer Ablauf der homologen Rekombination auf DNA-Ebene zur Konstruktion der HT1080 Zellen, die „Gen Aktiviertes“ EPO produzieren. Die Abbildung ist nicht maßstabsgerecht.

1.5.2 Produktionsprozesse für GA-EPO mit HT1080 Zellen

Für die Produktion von GA-EPO mit HT1080 Zellen wurden bereits ein Airlift-Verfahren sowie ein Perfusionsverfahren mit einer Perfusions/Bleeding-Strategie entwickelt (*Perfusionsprozess I*).

Bei Airlift-Verfahren in einem Schlaufenreaktor wird sowohl die Zellsuspension durch das eingetragene Gas mit Sauerstoff versorgt als auch die Durchmischung gewährleistet. Dadurch ist ein sehr viel größerer Gaseintrag als bei einem herkömmlichen Rührkesselreaktor notwendig. Zerplatzende Gasblasen üben einen erheblichen mechanischen Stress auf die Zellen aus, der die Vitalität der gesamten Zellkultur herabsetzen kann. Eine niedrige Vitalität kann sich negativ auf die Produktqualität auswirken, da tote Zellen Proteasen und Glycosidasen in das Medium abgeben. Teilgeschädigte Zellen können in ihrer Biosynthese gestört sein und dadurch z. B. nicht vollständig glycosylierte Proteine bzw. Proteine mit Glycanintermediaten (*high mannose type*) sezernieren. Die Aufreinigung des Produktes ist bei geringer Vitalität zudem aufwändiger, da auch nach der Zellabtrennung die Menge der Verunreinigungen durch Fremdproteine groß sein kann.

Um eine höhere Raum-Zeit-Ausbeute zu erreichen, wurde bereits vor Beginn dieser Arbeit begonnen, den Airlift-Prozess durch ein Perfusions/Bleeding-Verfahren zu ersetzen (*Perfusionsprozess I*). Beim Perfusions/Bleeding-Verfahren wird die in einem Rührkessel kultivierte Zellsuspension kontinuierlich durch ein Perfusionsmodul geleitet. Dabei wird ein Teil des Überstandes als Ernte abgeführt, während die Zellen wieder zurück in den Bioreaktor gepumpt werden. Der abgeführte Überstand wird durch frisches Medium ersetzt. Durch das kontinuierliche Ernten des Produktes wird dessen Verweilzeit im Reaktor gegenüber anderen Prozessen erheblich gesenkt und somit eine bessere Produktqualität ermöglicht. Ein Nachteil dieses Prozesses ist der hohe technische Aufwand. Durch das *bleeding* von Zellen können die verbleibenden Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer konstanten Zellzahl kultiviert werden.

1.6 Glycosylation Engineering

Die für die Glycosylierung von Proteinen verantwortlichen Glycosyltransferasen sind im Golgi sequenziell angeordnet (*vergl. Kapitel 1.2 auf Seite 4*). Dabei werden, nach der Theorie von Grabenhorst und Conradt, die katalytischen Domänen mit Hilfe ihrer CTS-Regionen (*Region mit cytoplasmatischer, transmembraner und stem Domäne*) an spezifischen Stellen im Golgi lokalisiert (Grabenhorst *et al.* 1999). Grabenhorst und Conradt konnten zeigen, dass durch den Austausch der CTS-Region und somit der Konstruktion von chimären Glycosyltransferasen, katalytische Domänen an anderen als den natürlichen Positionen im Golgi lokalisiert werden können. Es ist vorstellbar, dies für ein *glycosylation engineering* zu benutzen, um das Glycosylierungspotential von Zelllinien und damit die resultierenden Glycanstrukturen der gebildeten Proteine gezielt zu verändern. Z. B. könnte die katalytische Domäne der Glycosyltransferase, die die gewünschte Reaktion katalysiert, mit Hilfe einer fremden CTS-Region sequentiell vor der mit ihr in Konkurrenz stehenden Glycosyltransferase im Golgi lokalisiert werden, deren Reaktion nicht erwünscht ist. Sind die Konkurrenzsituationen und die Lokalisation der Glycosyltransferasen im Golgi bekannt, würde sich demnach das Glycosylierungspotential einer Zelllinie durch ein *glycosylation engineering* gezielt verändern lassen.

1.7 Allgemeine Zielsetzung

Der Produktionsprozess für GA-EPO mit HT1080 Zellen in einem Airlift-Bioreaktor soll durch einen robusten und konsistenten Prozess ersetzt werden, der eine höhere Raum/Zeit-Ausbeute erzielt. Dazu sollen sowohl die Proteinausbeute wie auch die qualitätsrelevanten Parameter auf der Stufe des *bulk harvests* verbessert werden. Bei diesen Parametern handelt es sich um die Qualitätsparameter, die die *in vivo* Halbwertszeit beeinflussen, d. h. das *glycan pattern* und der Grad der vollständig terminalen Sialylierung. Die Qualität des *bulk harvests* bestimmt die Gesamtausbeute an *drug substance*, da während der Aufarbeitung die Proteinfractionen mit geringer Antennarität und Sialylierung entfernt werden müssen, um eine hohe Wirksamkeit des Therapeutikums zu gewährleisten.

Für den neuen Prozess sollen ein neues Medium und eine neue Prozessführungsstrategie genutzt werden. Dabei handelt es sich um *major changes* im Herstellungsprozess. Da ein durch einen neuen Prozess produziertes Produkt sich als Therapeutikum hinsichtlich der Effektivität, der Sicherheit und der Qualität ändern und somit im Patienten eine andere Wirkung zeigen kann, muss das Produkt genau analysiert werden. Das mit dem neuen Prozess hergestellte GA-EPO muss auf der Stufe der *drug substance* vergleichbar zum GA-EPO aus dem Airlift-Prozess sein, da sich dieses bereits in der Zulassung zum Arzneimittel befindet. Der Nachweis der Vergleichbarkeit der Produkte aus dem geänderten und dem herkömmlichen Herstellungsprozess wird daher von den Behörden verlangt, wenn keine neuen klinischen Studien durchgeführt werden sollen (z. B. „*Note for the Guidance on Comparability of Medicinal Products containing Biotechnology-Derived Proteins as Drug Substance*“, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, EMEA 2002). Die wichtigsten Kriterien für eine Vergleichbarkeit im Rahmen der Prozessentwicklung sind die qualitätsrelevanten Parameter.

Mit dem bisherigen Perfusionsprozess, einer Perfusions/Bleeding- Strategie im Rührkessel (*Perfusionsprozess I*), wurde GA-EPO produziert, das auf der Stufe der *drug substance* hinsichtlich der wichtigsten Eigenschaft des Proteins, der Glycosylierung, nicht konsistent ist. Mit dem so produzierten Produkt kann keine Vergleichbarkeit zum GA-EPO aus dem Airlift-Prozess gezeigt werden. Um eine bessere Kenntnis des Prozesses zu erhalten und ihn hinsichtlich einer hohen Raum/Zeit-Ausbeute zu optimieren, dürfen die qualitätsrelevanten Parameter nicht erst auf der Stufe der *drug substance* analysiert werden, sondern müssen schon im *bulk harvest* und den Entwicklungsstufen dorthin bekannt sein. Diese Forderung steht im Einklang mit der Anleitung für die Industrie über prozessanalytische Technologie als Rahmen für innovative Herstellung und Qualitätssicherung von Pharmazeutika (*Process Analytical Technology PAT*) der *Food and Drug Administration (FDA)*, die ein besseres Verständnis des Produktionsprozesses verlangt. Um ein solches Verständnis zu erlangen, müssen u.a. bei jedem Verfahrensschritt die Qualitätseigenschaften des zu benutzenden Ausgangsmaterials bekannt sein. Die Übertragung der PAT-Anleitung auf den Produktionsprozess für GA-EPO bedeutet, dass die

Glycosylierung des GA-EPOs nicht erst während der Aufarbeitung analysiert werden sollte, sondern schon die Glycosylierung des Proteins im *bulk harvest*, der an die Aufarbeitung abgegeben wird, bekannt und konsistent sein soll. Dies ist die Voraussetzung für einen validierbaren Prozess.

Für die Entwicklung eines neuen Produktionsprozesses soll zunächst ein neues Medium für die Kultivierung etabliert werden, da die Glycosylierung u.a. von den Kultivierungsbedingungen abhängt (*vergleiche Kapitel 1.3*). Zur Erhöhung der Prozesssicherheit, zur Verringerung der Freigabekosten des Produkts und zur Verminderung der Heterogenität der Glycosylierung soll dieses Medium frei von *animal derived factor (ADF)* sein. Es soll sich die Entwicklung des Kultivierungsprozesses anschließen, der eine möglichst lange *in vivo* Halbwertszeit gewährleistet. Dazu soll die Analyse der qualitätsrelevanten Parameter implementiert werden. Dabei muß auch die Vergleichbarkeit des Produkts zum GA-EPO aus dem Airlift-Prozess beachtet werden. Bei einem hochwertigem *bulk harvest* wird eine konsistente und sehr effiziente Aufreinigung erwartet, die im Gegensatz zum Perfusionsprozess I validierbar ist.

Neben der Entwicklung eines geeigneten Prozesses kann die *in vivo* Halbwertszeit durch die Weiterentwicklung des Proteins zu einem *second generation* Produkt mit verbesserten Glycosylierungseigenschaften erhöht werden. EPO befindet sich bereits als *second generation* Produkt auf dem Markt. Z. B. wurden von der Fa. Amgen zur Verlängerung der *in vivo* Halbwertszeit zwei zusätzliche Glycosylierungsstellen in das EPO-Molekül eingefügt. Eine andere Strategie soll in dieser Arbeit verfolgt werden: Mittels eines *glycosylation engineering* sollen die Glycosylierungseigenschaften der Produktionszelllinie verändert werden. Dabei soll eine chimäre Glycosyltransferase stabil transfiziert werden. Das Lokalisationssignal dieser Transferase soll die katalytische Domäne einer Glycosyltransferase an einer gewünschten Stelle im Golgi positionieren, so dass die Konkurrenzsituation dieser Transferase zu einer anderen Glycosyltransferase zu Gunsten der chimären Transferase verschoben sein sollte. Diese Strategie soll an der O-Glycosylierung dargelegt werden, um so das *proof of concept* für die

Verwendung chimärer Glycosyltransferasen zur Produktion von Proteinen mit gezielt verbesserten Glycosylierungseigenschaften zu zeigen.

1.8 Aufgabenstellung

Aus der allgemeinen Zielsetzung ergeben sich die hier aufgeführten, konkreten Aufgabenstellungen:

- Definition der qualitätsrelevanten Parameter und Identifikation einer geeigneten Methode für die Analyse der Glycanstrukturen während der Prozessentwicklung
- Untersuchung der Glycanstrukturen des GA-EPOs aus den bisherigen Produktionsprozessen zur Prüfung der Vergleichbarkeit und als Standard für die Prozessentwicklung
- Entwicklung eines ADF-freien Mediums unter Berücksichtigung der Produktqualität
- Entwicklung von Produktionsprozessen (*Batch*, *repeated Batch* und *Perfusion*) bis zur Stufe des *bulk harvests* mit implementierten qualitätsrelevanten Parametern
- *Proof of concept* eines *glycosylation engineerings* der HT1080 GA-EPO Zelllinie an der O-Glycosylierung durch die chimäre Glycosyltransferase *gnt1-C2Gnt1*

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen

HT1080:

Die Zelllinie HT1080 ist eine humane Fibrosarcomzelllinie, die 1972 von einem Spender gewonnen wurde, der weder einer Chemo- noch einer Strahlentherapie ausgesetzt war. Rasheed führte Langzeitkultivierungen von 10 Monaten in 60 Subkultivierungen durch, bei denen gezeigt wurde, dass sich die Wachstumsrate nicht verringerte (Rasheed *et al.* 1974). Aufgrund der Wirtsspezifität besitzt die Zelllinie ein humanes posttranslationales Modifizierungspotential. Die Zellen wachsen in proteinhaltigen, serumfreien DMEM F12 (1:1) Medium in Suspension.

HT1080 GA-EPO:

Das EPO-Gen der HT1080 Zelllinie wurde aktiviert, indem der natürliche, inaktive EPO Promotor durch homologe Rekombination durch einen CMV Promotor ersetzt wurde (WO 94/12650) (*vergl. Kapitel 1.5.1, Seite 18*). Die Zellen wachsen in serumfreien, proteinhaltigen SMIF 7 Medium in Suspension.

BHK EPO:

Bei den BHK EPO Zellen handelt es sich um die mit dem Plasmid pCR EPO stabil transfizierte BHK-21 Zelllinie (ATCC CCL 10), die von Dr. H. S. Conradt zur Verfügung gestellt wurde. Die Zellen wachsen adhärent in DME-Medium und sind für die Langzeitkultivierung serumabhängig.

BHK IL2:

Die BHK IL2 Zelllinie entstand durch stabile Transfektion der BHK-21 Zelllinie (ATCC CCL 10) mit dem Plasmid pBR 322. Das Plasmid enthält das humane IL2 Gen unter Kontrolle eines SV 40 Promotors (Conradt *et al.* 1989; Conradt *et*

al. 1985). Diese Zelllinie wurde von Dr. H. S. Conradt zur Verfügung gestellt. Die Zellen wachsen adhärent in DME-Medium und sind für die Langzeitkultivierung serumabhängig.

2.1.2 Expressionsvektoren

Die in Abbildung 2.1 dargestellten Expressionsvektoren wurden für die Transfektionen benutzt. Sie wurden von Dr. H. S. Conradt zur Verfügung gestellt.

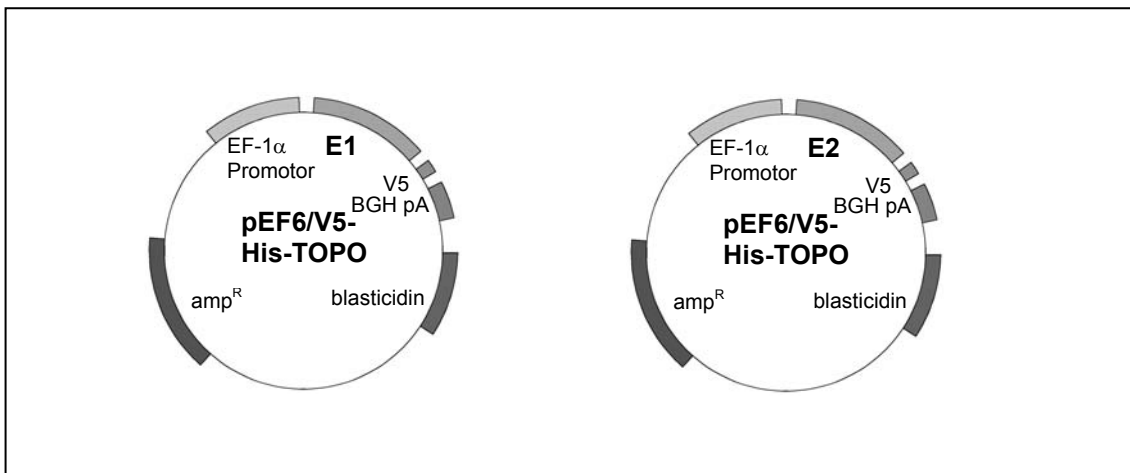


Abbildung 2.1: Schema von Expressionsvektoren. BGH pA: *Bovine growth hormone* Polyadenylierungsstelle, E1: wt-C2GnT1, E2: gnt1-C2GnT1

2.1.3 Zellkultur – Medien

Folgende Medien wurden zur Kultivierung der HT1080 GA-EPO-Zellen verwendet:

Tabelle 2.1: Medien zur Kultivierung von HT1080 GA-EPO Zellen

Medium	Besonderheiten	Hersteller
SMIF 7/2	ADF-haltiges Batch-Medium	Gibco, Karlsruhe
SMIF 7/3	ADF-haltiges Perfusions-Medium, aufgestocktes SMIF 7/2 (Glucose und Glutamin)	Gibco, Karlsruhe
DMEM F12 PDM 3	ADF-haltiges Medium mit BSA und hu. Transferrin	Gibco, Karlsruhe
DMEM F12 PDM 5	ADF-freies Medium, entspricht DMEM F12 PDM 3 ohne BSA und hu. Transferrin, enthält zusätzlich Aurintricarbonsäure und EDTA	Gibco, Karlsruhe
DMEM F12 PDM 5.1	Entspricht DMEM F12 PDM 5, enthält zusätzlich 8,4 µmol/l Eisencitrat	Gibco, Karlsruhe
DMEM F12 PDM 5.2	Entspricht DMEM F12 PDM 5, enthält zusätzlich 3 µmol/l Eisencitrat	Gibco, Karlsruhe
DMEM F12 PDM 5.3	Entspricht DMEM F12 PDM 5, enthält zusätzlich 6 µmol/l Eisencitrat	Gibco, Karlsruhe
DMEM F12 PDM 5.4	Entspricht DMEM F12 PDM 5, enthält zusätzlich 1,5 µmol/l Eisencitrat	Gibco, Karlsruhe
CD-Hybridoma	ADF-freies Fertigmedium	Gibco, Karlsruhe
Pro CHO4 CDM	ADF-freies Fertigmedium, Ausgangsmedium zum Pro CHO Media System	Cambrex, Oldendorf
CHO#6k	ADF-freies Fertigmedium, Medium Nr. 6 des Pro CHO Media Systems	Cambrex, Oldendorf
BD Cell Mab Animal Component-Free	ADF-freies Fertigmedium	BD Biosciences, Heidelberg
BD Cell Mab Serum Free	ADF-freies Fertigmedium	BD Biosciences, Heidelberg
Hybridoma SFM	ADF-freies Fertigmedium	Invitrogen, Karlsruhe
MAN-PF 2	ADF-freies Fertigmedium	AMIMED, Basel
Opti Pro SFM	ADF-freies Fertigmedium	Invitrogen, Karlsruhe
Ultra Culture	ADF-freies Fertigmedium	Cambrex, Oldendorf
Ultra Doma PF	ADF-freies Fertigmedium	Cambrex, Oldendorf

2.2 Zellkultur

Die Arbeiten zur Zellkultivierung wurden unter einer Hera Safe Sterilbank der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt.

Die Kultivierung der Zellen in Well-Platten, T-Flaschen und Spinnerflaschen erfolgte in einem CO₂-Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.2.1 Cryokonservierung und Revitalisierung

Cryokonservierung:

Zur Cryokonservierung wurden Zellkulturen verwendet, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Die Werte von Produktivität und Produktqualität der für die Cryokonservierung vorgesehenen Kulturen lagen in der Größenordnung der Werte von Stammhaltungskulturen.

Die Zellen wurden bei 200 g für 5 min abzentrifugiert (*Labofuge A, Heraeus Sepatech, Osterode*), und mit einer Zellzahl von $1 \cdot 10^7$ Zellen / ml in Einfriermedium aufgenommen. Zügig wurden pro Cryoröhrchen 1,8 ml Zellsuspension abgefüllt. Ein gefülltes Cryoröhrchen wurde sofort in ein spezielles Einfriergefäß (*Mr. Frosti, Fa. Nalgene, Rochester, USA*) überführt und über 2 Tage bei -70 °C gelagert. Das Einfriergefäß gewährleistet eine langsame Abkühlung der Zellsuspension. Anschließend wurden die Cryoröhrchen in die Gasphase eines Cryotank mit flüssigem Stickstoff überführt. Das Einfriermedium bestand aus 10 % DMSO (*Sigma-Aldrich, Taufkirchen*), 40 % konditioniertem Medium und 50 % frischem Medium.

Revitalisierung:

Ein Cryoröhrchen aus dem Cryotank wurde im Wasserbad bei 37 °C ohne Einwirkung von mechanischem Stress aufgetaut. Die Zellsuspension wurde zwei Mal mit Medium gewaschen (*Zentrifugation mit 200 g für 5 min*) und dann in 25 ml Medium in einer T-Flasche (*Nunc, Wiesbaden*) mit 85 cm² Grundfläche für eine Nacht kultiviert.

2.2.2 Kultivierung von HT1080 (GA-EPO) Zellen in Spinnerflaschen

Nach der Revitalisierung wurden die *wt*-HT1080 und die HT1080 GA-EPO Zellen in Spinnerflaschen (*Labtech International, Burkhardtsdorf*) kultiviert, die mit Hilfe von Spinnertableaus (*Cell Spin, Integra Biosciences, München*) bei

40 Upm durchmischt wurden. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Brutschrank (*Forma Scientific, Marietta, Ohio*). Je nach benötigtem Kulturvolumen wurden die Spinnerflaschen mit einem angegebenen Nennvolumen von 125 ml, 250 ml, 500 ml bzw. 1000 ml mit ca. 50 ml, 80 ml, 130 ml bzw. 255 ml Zellsuspension benutzt. Die Zellen wurden dreimal wöchentlich während ihrer exponentiellen Wachstumsphase bzw. bei Lactatkonzentrationen über 1,5 g/l passagiert, so dass die initiale Zellkonzentration bei $3,0 \cdot 10^5$ Zelle / ml lag und die Lactatkonzentration unter 0,7 g/l. In Ausnahmefällen wurde ein Teil der Zellkultur abzentrifugiert und deren verbrauchtes Medium durch frisches ersetzt, um die erwünschte Lactatkonzentration zu erreichen.

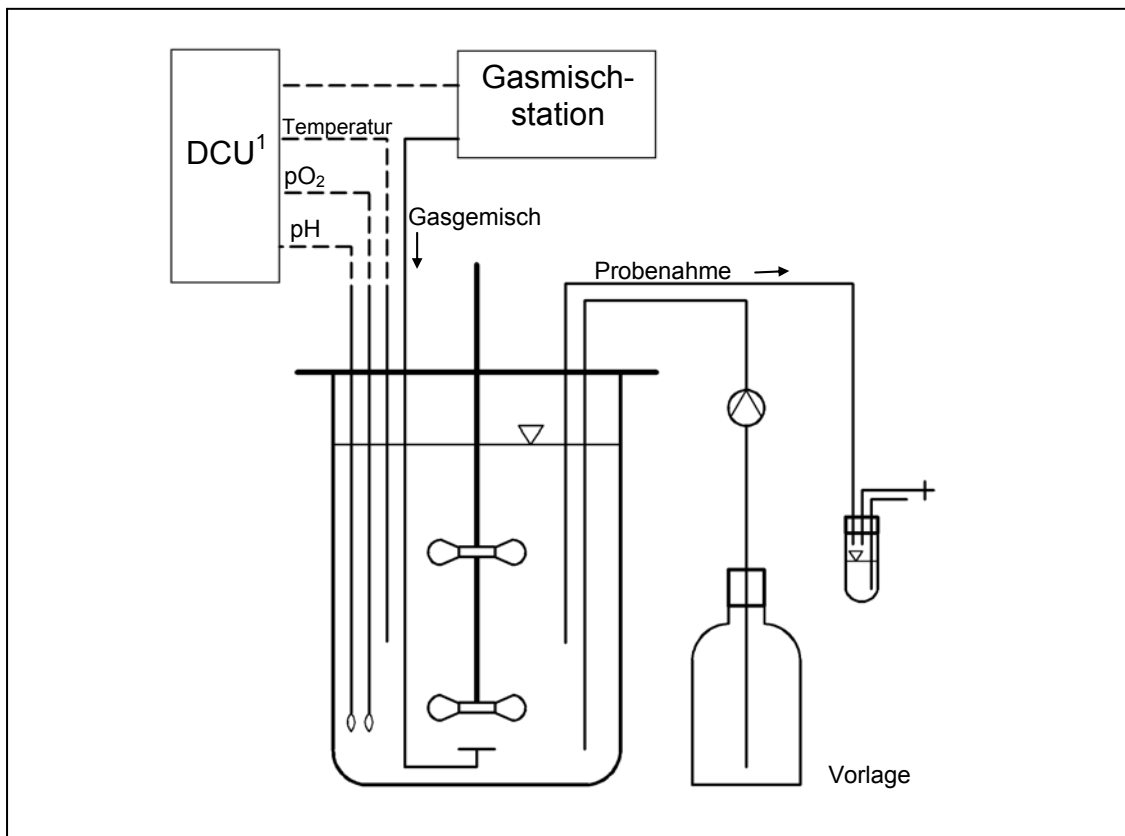
2.2.3 Kultivierung der adhärent wachsenden BHK EPO und BHK IL2 Zellen

Je nach benötigtem Kulturvolumen wurden die BHK EPO und BHK IL2 Zellen in T-Flaschen mit einer Grundfläche von 25 cm², 85 cm² bzw., 175 cm² mit 10 ml, 25 ml bzw. 50 ml Medium kultiviert. Die Zellen wurden bei Konfluenz passagiert, ein zusätzlicher Mediumwechsel wurde durchgeführt, wenn die Zellen nicht dreimal wöchentlich passagiert werden konnten. Bei den Passagen wurden die Zellen 1:5 verdünnt. Die Zellen wurden mit Accumax (*PAA, Linz*) von der Oberfläche abgelöst.

2.2.4 Kultivierung von HT1080 GA-EPO Zellen in Bioreaktoren

2.2.4.1 Kultivierung im Batch-Modus

Zellen aus der Vorkultivierung in Spinnerflaschen wurden während der exponentiellen Wachstumsphase mit einer Zellkonzentration von $3 \cdot 10^5$ Zellen / ml in den Bioreaktor (*Biostat A, B.Braun Biotech, Melsungen*) überführt. Abbildung 2.2 zeigt die schematische Darstellung des benutzten Rührkessels.



¹DCU: Digital Control Unit

Abbildung 2.2: Schematische Darstellung eines Bioreaktors aufgesetzt für den Batch-Betrieb.

Die Bioreaktoren (*B.Braun Biotech, Melsungen*) waren mit einer pH-, einer pO_2 - (beide: *Mettler Toledo, Giessen*) und einer Temperatursonde ausgestattet, deren Messwerte die DCU (*Digital Control Unit: B.Braun Biotech, Melsungen*) befähigen diese Parameter zu regeln. Die DCU stand mit einer Gasmischstation in Kontakt, die über die Gase N_2 , O_2 , CO_2 und Druckluft die Gelöstsauerstoffkonzentration bei 40 % Luftsättigung und den pH Wert bei pH 7 ermöglichte. Die Gase wurden über eine Ringbrause eingetragen. Die Temperatur wurde bei den Bioreaktoren mit 2 l Arbeitsvolumen bzw. 10 l Arbeitsvolumen über eine Heizdecke bzw. über das den Doppelmantel versorgende Wasserbad bei 37 °C geregelt. Zwei bzw. vier Paddelrührer wurden bei 120 Upm bzw. 80 Upm betrieben (*Bioreaktoren mit 2 l bzw. 10 l Arbeitsvolumen*). Zudem waren die Bioreaktoren mit einer Probenahmeverrichtung und einer Vorlageflasche ausgerüstet.

2.2.4.2 Kultivierung im Perfusions-Modus

Zusätzlich zu der Ausstattung des Batch-Bioreaktors wurde für die Kultivierung im Perfusionsmodus ein *Cross Flow* Modul (Membrapur, Bodenheim) über eine Zirkulationsleitung angeschlossen. Abbildung 2.3 zeigt das Schema des Perfusionsbioreaktors.

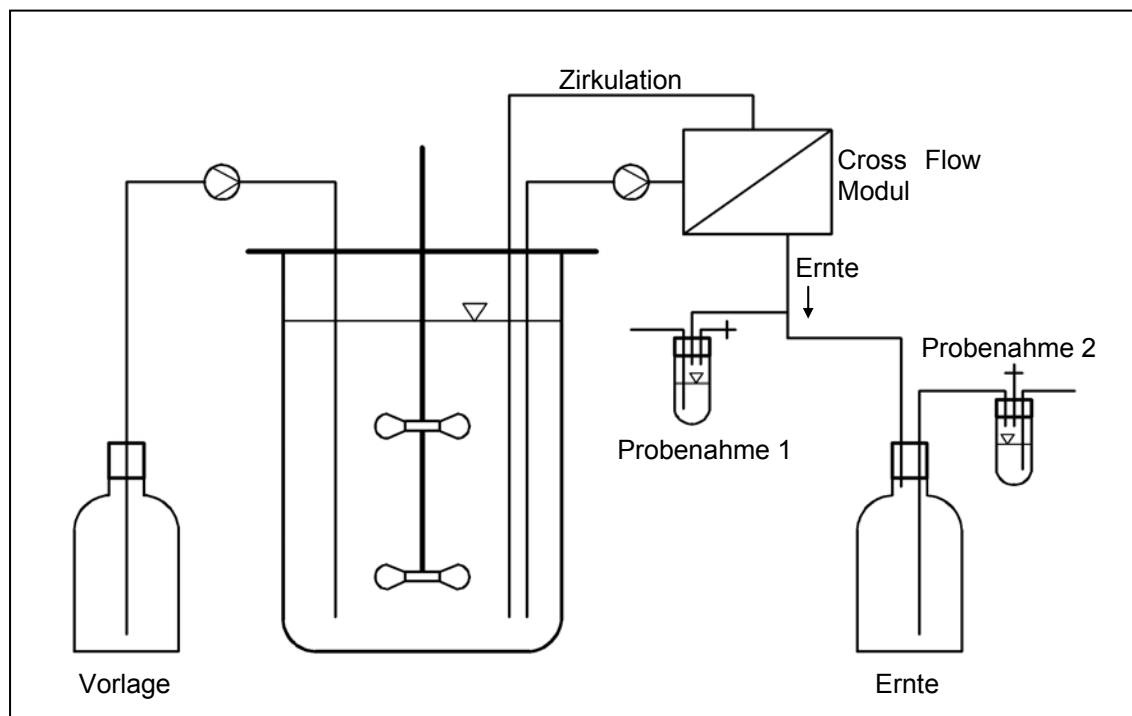


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung eines Bioreaktors, zusätzliches Equipment für die Perfusionskultivierung.

Die zellfreie Ernte wurde in ein Erntegefäß geleitet, das in einem Kühlschrank bei 4 °C temperiert wurde. Probenahmevorrichtungen befanden sich an der Ernteleitung sowie am Erntegefäß.

2.2.4.3 Perfusionsmodul

Als Perfusionsmodul wurde ein *cross flow* Modul verwendet. Hierzu wurden die Consep Filterhalter der Fa. Membrapur (Bodenheim) mit zwei Durapore Membranen der Fa. Millipore (Eschborn) bestückt, die eine Porengröße von 0,65 µm und eine Fläche von 300 cm² aufwiesen. Am Eingang und an der Ernteleitung war das *cross flow* Modul mit jeweils einem Manometer bestückt. Vor der Inbetriebnahme wurden die Membranen 30 min lang mit deionisiertem

Wasser gespült. Das gesamte Modul wurde durch Autoklavieren sterilisiert. Je nach Belastung des Moduls musste es nach 3 bis 5 Tagen gewechselt werden. Notwendig wurde dies bei Transmembrandrücken über 150 mbar.

2.2.5 Adaption von HT1080 GA-EPO Zellen an andere Medien

Die Adaption der HT1080 GA-EPO Zellen erfolgte während der Kultivierung in Spinnerflaschen mit einem Nennvolumen von 500 ml und einem Arbeitsvolumen von 130 ml. Die Kultivierung erfolgte gemäß Kapitel 2.2.2. Bei jeder Passage werden jeweils 50 % des verbliebenen Ausgangsmediums mit dem Medium, an das die Zellen adaptiert werden sollen, ersetzt. Nach drei Wochen Adaption enthält die Kultur demnach noch 0,02 % des Ausgangsmediums.

2.2.6 Wachstumskurven

2.2.6.1 Wachstumskurven in Spinnerflaschen

Für die Wachstumskurven in Spinnerflaschen wurden an das zu überprüfende Medium adaptierte Zellen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, für 5 min bei 200 g abzentrifugiert und derart in frischem Medium aufgenommen, dass 120 ml einer Zellsuspension mit 2,5 bis $3,5 \cdot 10^5$ Zellen / ml vorlagen. Diese wurde in eine Spinnerflasche mit einem Nennvolumen von 500 ml übertragen und kultiviert. Für die Analytik wurden täglich 7 ml Zellsuspension entfernt, mit denen die Zellzahl, die Vitalität, die Morphologie der Zellen, der pH Wert, Glucose-, Lactat-, Glutamin-, Glutamat-, Ammoniumion- und die Produktkonzentration sowie die Produktqualität analysiert wurden.

2.2.6.2 Wachstumskurven in Bioreaktoren

Für die Wachstumskurven im Bioreaktor wurden die an das zu überprüfende Medium adaptierten Zellen in einem 2 l Bioreaktor vorkultiviert und in der exponentiellen Phase geerntet. Sie wurden für 5 min bei 200 g abzentrifugiert und derart in frischem Medium aufgenommen, dass 2 l einer Zellsuspension mit 2,5 bis $3,5 \cdot 10^5$ Zellen / ml vorlagen, die in einen weiteren 2 l Bioreaktor überführt wurden. Für die Analytik wurden täglich 50 ml Zellsuspension entfernt, mit denen die Zellzahl, die Vitalität, die Morphologie der Zellen, der pH Wert,

Glucose-, Lactat-, Glutamin-, Glutamat-, Ammoniumion- und die Produktkonzentration sowie die Produktqualität analysiert wurden.

2.2.7 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung

Die Zellzählung und die Vitalitätsbestimmung erfolgten mit dem Cedex Analysesystem mit Autosampler (*Innovartis, Bielefeld*), das nach der Trypan-Blau Ausschlussmethode arbeitet (Lindl 2000). Hierbei wird die vorgelegte Zellsuspension automatisch durch das Gerät mit Trypan-Blau versetzt, inkubiert und Bilder von 20 Beschickungen einer Zählkammer gespeichert und ausgewertet. Die Bilder werden mit Hilfe eines Mikroskops und einer Messzelle von einem definierten Probenvolumen aufgenommen. Die Bildanalysesoftware bestimmt die Anzahl der Trypan-Blau gefärbten Zellen im Verhältnis zu den nicht gefärbten Zellen sowie die Zellkonzentration, die Größenverteilung etc.. Trypan-Blau färbt Zellen mit Defekten in der Membran, die dann als tot angesehen werden. Apoptotische Zellen werden nicht erfasst.

2.2.8 Bestimmung von Mediumparametern

2.2.8.1 Glucose- und Lactatkonzentration

Die Bestimmung der Glucose- und Lactatkonzentration von Zellkulturüberständen erfolgt mit dem Glucose/Lactatanalysator YSI 2700 Select der Fa. YSI, Yellow Springs. Die Messung basiert auf einem enzymatisch-elektrochemisch gekoppelten Prozess, bei dem das von den Enzymen Glucose- bzw. Lactat-Oxidase gebildete H_2O_2 mit einer nachgeschalteten Pt/AgCl/Ag-Elektrode amperometrisch gemessen wird.

2.2.8.2 Glutamin-, Glutamat- und Ammoniumionenkonzentration

Die Bestimmung der Glutamin-, Glutamat- und Ammoniumionenkonzentration erfolgte mit dem Bioprofil 200, IUL Instruments, Königswinter.

Glutamin- und Glutamatkonzentration:

Die Glutaminmessung basiert auf der Menge des Produktes Glutamat, das bei der Reaktion von Glutamin und Wasser in Gegenwart des Enzyms Glutaminase entsteht. Das Glutamat reagiert in der Folgereaktion mit Sauerstoff in Gegenwart der Glutamatoxidase zu Ketoglutarat, Ammoniak und H_2O_2 . Bei einer konstanten Spannung von 0,7 Volt an einer Platinelektrode wird das H_2O_2

zu 2H^+ , O_2 und 2 Elektronen oxidiert. Der an der Platinelektrode gemessene Strom ist proportional zur Konzentration des Glutamats bzw. des Glutamins in der Probe.

Ammoniumionenkonzentration:

Durch eine ionenselektive Flüssigkeits-Membranelektrode werden die NH_4^+ -Ionen der Probe potentiometrisch detektiert, dabei hängt der Messwert von der Referenzelektrode ab.

2.2.9 Transfektion mit Expressionsvektoren

HT1080 GA-EPO, BHK EPO und BHK IL2 Zellen wurden adhärent in 6-well Platten kultiviert. Die Transfektion wurde bei ca. 60 % Konfluenz durchgeführt. Eine halbe Stunde vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt. 3,2 μg DNA wurden mit H_2O (*ad* 92,6 μl) verdünnt und kurz vermischt. Dazu wurden 7,4 μl des Transfektionsreagenz Polyfect (*Qiagen, Hilden*) gegeben und für 10 s vermischt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wird das Gemisch auf die Zellen gegeben. Die Selektion mit Blasticidin begann nach 24 h.

2.2.10 Subklonierung

Die selektionierten Zellen wurden für die Subklonierung in unterschiedlichen Verdünnungsstufen in 96-well Platten kultiviert. Mit Hilfe des Bilderfassungssystems CellScreen der Fa. Innovartis (*Bielefeld*) konnte das Wachstum von Zellen täglich verfolgt werden und bei Zellansammlungen zurückverfolgt werden, ob es sich um einen Zellklon handelt. Zellansammlungen, bei denen es sich um Zellklone handelte, wurden mit Hilfe einer Pipette aus dem *well* gelöst und in einem neuen *well* kultiviert. Diese Zellen wurden weiter überwacht und noch einmal subkloniert. Diese Methode der Subklonierung musste gewählt werden, da die HT1080 Zellen nicht als Einzelzelle in 96-well Platten kultivierbar waren.

2.3 Proteinanalytik

2.3.1 Quantitative Proteinanalytik

Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford bestimmt (Bradford 1976). Als Referenzprotein wurde BSA (*Sigma-Aldrich, Taufkirchen*)

verwendet. Es wurden je 100 µl der Standardlösung in den Konzentrationen 0,78; 1,56; 3,13; 6,25; 12,5; 25 und 50 µg / ml und der Probenlösung in den Verdünnungen 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 und 1:128 in eine 96-well Platte vorgelegt und mit jeweils 100 µl des 1:5 verdünnten Protein Assay Farbkonzentrats bestehend aus Coomassie brilliant blue G-250, Methanol und Phosphorsäure (*Bio-Rad Laboratories, München*) für 10 min auf einem Schüttler (150 rpm) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion wurde mit einem Photometer bei 590 nm ermittelt und der Proteingehalt der Proben anhand der BSA Referenzgeraden berechnet.

2.3.2 Proteinfällung

Ethanol-Fällung

Zur Fällung von Protein mit Ethanol wurde die Proteinlösung derart mit eiskaltem Ethanol (*Merck, Darmstadt*) vermischt, dass 70 % Ethanol vorlag. Die Fällung erfolgte für 2 h bei -20 °C. Nach 10 min Zentrifugation bei 10000 g (*Biofuge pico, Kendro Laboratory Products, Osterode*) konnte die Ethanolphase abgenommen und das Proteinpellet getrocknet werden.

Methanol-Chloroform-Fällung

100 µl der Proteinlösung wurden mit 400 µl eiskaltem Methanol (*Merck, Darmstadt*), 100 µl Chloroform (*Merck, Darmstadt*) und 300 µl eiskaltem deionisiertem Wasser (*Milli-Qplus 18, Millipore, Molsheim*) mit dem Vibrationsmischer vermischt und für 2 min auf Eis inkubiert. Danach wurde für 2 min bei 10000 g zentrifugiert und der Überstand (*Chloroform*) abgenommen. Anschließend wurden weitere 300 µl eiskaltes Methanol zugegeben, mit dem Vibrationsmischer gemischt und noch einmal für 5 min bei 10000 g zentrifugiert. Danach konnte die Methanolphase abgenommen und das Pellet getrocknet werden.

2.3.3 SDS PAGE

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen zu analytischen Zwecken erfolgte unter reduzierenden Bedingungen durch SDS Gelelektrophorese (*Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese*) in einem diskontinuierlichen System nach Laemmli (Laemmli 1970). Die mit Ethanol oder Methanol-Chlorophorm präzipitierten Proteine wurden nach der Trocknung in

SDS Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95 °C inkubiert. Die gelelektrophoretischen Auftrennungen wurden in 12 % bzw. 14 % Acrylamidgelen durchgeführt, die mit einem 3 % Sammelgel überschichtet waren (*Elektrophoreseapparatur: Fa. Biometra, Göttingen*). Die Detektion der aufgetrennten Proteine erfolgte durch Anfärbung mit Coomassie-Brillantblau bzw. durch Western Blot Analysen. Probenpuffer, Laufpuffer und Gele sowie Coomassie-Brillantblau wurden gebrauchsfertig von der Fa. Anamed, Darmstadt, bezogen.

2.3.4 Western Blot

Der spezifische Nachweis der durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine erfolgte immun-chemisch nach Elektrotransfer auf eine Nitrocellulosemembran mittels *semidry-blotting* (*Bio Rad Laboratories, München*). Dazu wurden auf die Anoden-Platte ein Filterpapier (*Bio Rad Laboratories, München*), das in Anodenlösung I und ein Filterpapier, das in Anodenlösung II getränkt wurde, gelegt. Darauf folgte die in Anodenpuffer II hydrophilisierte Nitrozellulosemembran (*Schleicher & Schuell, Dassel*), auf die das SDS-Gel gelegt wurde. Anschließend folgten ein Filterpapier, das in Kathodenlösung getränkt wurde und danach die Kathodenplatte. Ein Gel wurde für eine Stunde bei 180 mA, zwei Gele für eine Stunde bei 360 mA geblottet.

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran nach dem Blotvorgang 30 min bei 37 °C in Blockpuffer geschwenkt. Der spezifische Nachweis von EPO bzw. IL2 erfolgte durch Inkubation der abgesättigten Membran mit einem anti-EPO Antiserum vom Kaninchen (*1:1000 in Blockpuffer*) bzw. mit einem anti-IL2 Antiserum von der Maus (*1:500 in Blockpuffer*) über Nacht. Nach dem Waschen der Membran mit TBS folgte die Inkubation mit einem anti-Kaninchen bzw. anti-Maus IgG-Peroxidase Konjugat von der Ziege (*1:500 in Blockpuffer*) für 2 h. Anschließend wurde die Membran wieder mit TBS gewaschen. Der Nachweis der Immunkomplexe erfolgte durch die Überführung der Membran in die Färbelösung.

Kathodenlösung: 40 mmol / l 6- Aminohexansäure, 20 % Methanol (v/v)
Anodenlösung I: 300 mmol / l Trisbase, 20% Methanol (v/v)
Anodenlösung II: 25 mmol / l Trisbase, 20 % Methanol (v/v)

Blockpuffer:	30 g BSA, 1,21 g Tris Base, 9 g NaCl, 100 ml Serum (Invitrogen, Auckland) ad 1 l H ₂ O (MilliQ)
TBS:	50 mmol/l Trisbase, 0,8 % (w/v) NaCl, 0,02 % (w/v) KCl, pH 7,4
NBT-Färbelösung:	200 µl NBT/BCIP Stock Solution (Roche Diagnostics, Mannheim) in 10 ml Färbelösung
Färbelösung:	0,1 M Tris, 0,1 M NaCl, 0,05 M MgCl ₂ pH 9,5
Stopplösung:	10 mM Tris 1mN EDTA pH 7,5

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien bei der Fa. Merck, Darmstadt, erworben.

2.3.5 ELISA zur Konzentrationsbestimmung von EPO

Der verwendete Sandwich-ELISA zur Bestimmung der EPO Konzentration wies einen Messbereich von 1 – 10 ng / ml und eine Nachweisgrenze von 0,5 ng / ml auf. Je Kavität wurden immer 100 µl pipettiert; es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Als Referenzstandard wurde EPO mit den Konzentrationen 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,313 und 0,156 ng / ml verwendet. Für die Proben standen zwei Verdünnungsschemata von 1:10 bis 1:1000 bzw. von 1:5000 bis 1:500.000 zur Verfügung.

Zur Durchführung des ELISAs wurde eine Mikrotiterplatte (*Dade Behring, Marburg*) mit dem polyklonalen Kaninchen-anti-EPO-IgG Immobilisierungsantikörper (*Dade Behring, Marburg*) beschichtet, der zuvor mit PBS (*Invitrogen, Auckland*) auf 10 µg / ml eingestellt wurde. Die Verdünnung der Proben erfolgte mit Hilfe des Zinsser-Pipettierroboters (*Zinsser Analytik, Frankfurt*). Die folgenden Wasch- und Pipettierschritte wurden mit dem Behring-ELISA-Prozessor II (*Behringwerke, Marburg*) durchgeführt. Der primäre Antikörper wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert, anschließend wurden die nicht gebundenen Antikörper mit Waschpuffer entfernt. Im nächsten Inkubationsschritt (1 h) wurde das in den Proben enthaltene EPO an den primären Antikörper gebunden. Anschließend wurde ein anti-Kaninchen IgG-Peroxidase Konjugat von der Ziege (*Calbiochem, Bad Soden*) zugegeben, das sich an das EPO bindet (1 h). Nicht gebundenes Konjugat wurde wieder ausgewaschen. Danach erfolgte die Zugabe des chromogenen TMB-Substrats (*Sigma-Aldrich, Taufkirchen*). Nach 30 min wurde die Entwicklung der

Farbreaktion durch 1 M H_2SO_4 (Merck, Darmstadt) beendet und die Mikrotiterplatte photometrisch bei 450 nm gemessen.

2.3.6 Reinigung von EPO mittels Immunaффinitätschromatographie

Die Aufreinigung von EPO aus Zellkulturüberständen erfolgte mittels Immunaффinitätschromatographie. Die Immunaффinitätssäule wurde durch Kopplung von 10 mg des monoklonalen anti-EPO Antikörpers (MAK 89-146/0056) an eine HiTrap™ NHS-aktivierte Sepharose-Säule (1 ml) (Amersham Biosciences, Uppsala) angefertigt. Die Kopplung wurde nach Angaben von Amersham Biosciences AB (Uppsala, Schweden) durchgeführt.

Vor dem Auftragen der EPO haltigen Probe wurde die Immunaффinitätssäule mit Waschpuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,4) 45 min bei einer Flussrate von 0,5 ml / min äquiliбriert. Das Chromatographieprofil wurde durch Messung der Extinktion bei 280 nm erstellt und mit einem Integrator aufgezeichnet. Das Beladen der Säule mit der Probe erfolgte bei einer Flussrate von 0,5 ml / min. Die Säule wurde anschließend mit Waschpuffer bei einer Flussrate von 0,5 ml / min gewaschen bis eine konstante Basislinie erreicht wurde. Kontaminierende Proteine wurden durch Zugabe von Vorelutionspuffer (20 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,4) entfernt, während gebundenes EPO mittels 25 mM Na_2HPO_4 , pH 11,5 bei einer Flussrate von 1 ml / min eluiert wurde. Das Eluat wurde in 500 µl Fraktionen gesammelt und durch Vorlage von 100 µl 100 mM NaH_2PO_4 , pH 4,4 neutralisiert.

Schnellmethode

Für die Schnellmethode wurde die Affinitätssäule über Spritzen mit der Hand beschickt. Dazu wurde die Säule mit 10 ml Waschpuffer äquiliбriert, mit Probe beladen und mit weiteren 10 ml Waschpuffer gewaschen. Es wurden 3 ml Vorelutionspuffer benutzt, dann wurde mit 500 µl Elutionspuffer der Vorelutionspuffer von der Säule verdrängt. Es folgte eine 2 minütige Inkubationszeit, an die sich die Elution des EPOs mit 1,5 ml Elutionspuffer anschloss. Das Eluat wurde mit 100 mM NaH_2PO_4 , pH 4,4 neutralisiert.

Die Reinheit der aufgereinigten Proben wurde via SDS Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen überprüft.

2.3.7 Zellyse

$5 \cdot 10^6$ bis $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit 100 µl Triton X haltigem Lysispuffer für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 20 Mal auf- und abpipettiert und bei 13000 g zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und das darin enthaltene Protein mit Ethanol gefällt und auf ein SDS Gel aufgetragen.

Lysispuffer:

20 mM MES pH 6,5
1 mM DTE
1 % (v/v) Triton X-100
0,02 % Natriumazid
10 µg/ml Antipain-dihydrochlorid
2,5 µg/ml Bestatin
3 µg/ml Chymostatin
10 µg/ml E-64
2,5 µg/ml Leupeptin
2,5 µg/ml Pepstatin
10 µg/ml Phosphoramidon
1 µg/ml Aprotinin

2.4 Glycananalyse

2.4.1 Überblick über die Analytik der N-Glycane

In Abbildung 2.4 werden die einzelnen Schritte zur Analyse der N-Glycane gezeigt. In den Kapiteln 2.4.2 bis 2.4.7 sind die einzelnen Analytikmethoden dargestellt. Die Abweichungen der Schnellmethode zur herkömmlichen Analytik sind unter den einzelnen Analysen beschrieben. Die gelb hinterlegten Analysen gehören nicht zur Schnellmethode.

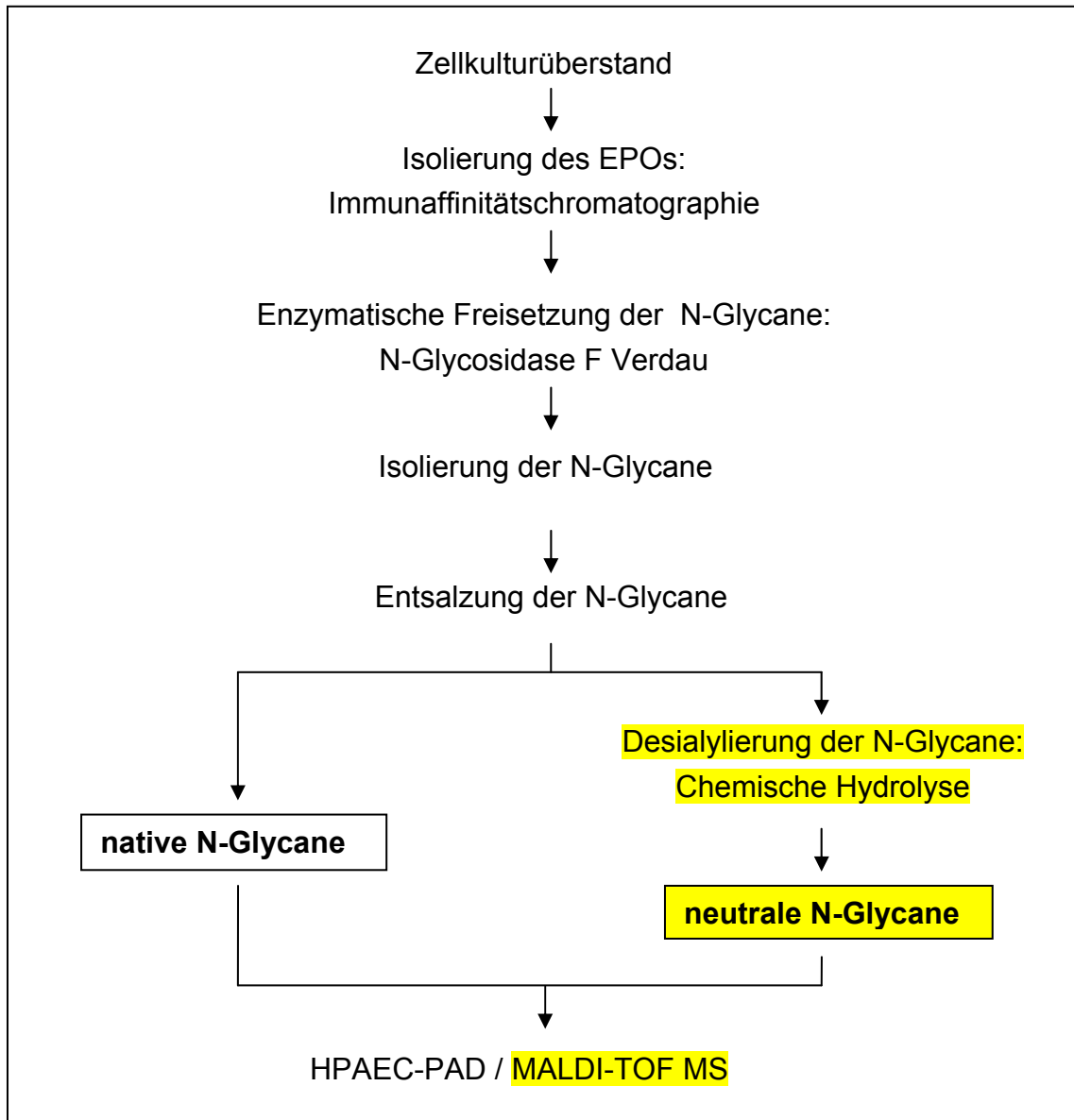


Abbildung 2.4: Schema der Aufreinigung und Probenvorbereitung bis hin zur Analyse von EPO. Die gelb hinterlegten Schritte gehören nicht zur Schnellmethode.

2.4.2 Enzymatische Freisetzung der N-Glycane

Zur enzymatischen Freisetzung der N-Glycane wurde die Endoglykosidase PNGase F (*Peptid-N⁴-(Acetyl- β -GlucosaminyI) Asparaginamidase*, Roche Diagnostics, Mannheim) benutzt, die die N-glykosidische Bindung zwischen der Kohlenhydratkette und dem Asparagin des Polypeptids spaltet. (Dwek *et al.* 1993). Dazu wurden 2 U PNGase F pro 10 μ g Protein eingesetzt. Die Reaktion erfolgte über Nacht bei 37 °C. Die Vollständigkeit der Abspaltung wurde mit

Hilfe einer SDS Gelelektrophorese überprüft. Für die Schnellmethode wurden 20 U PNGase F pro 10 µg Protein eingesetzt und für 1,5 h bei 37 °C verdaut.

2.4.3 Isolierung der N-Glycane

Isolierung mittels Ethanolpräzipitation

Nach der enzymatischen Freisetzung der N-Glycane wurde die Lösung mit den N-Glycanen und dem de-N-glycosylierte Protein derart mit eiskaltem Ethanol vermischt, dass 70 % Ethanol vorlag. Die Fällung erfolgte für 2 h bei -20 °C. Nach 10 min Zentrifugation bei 10000 g konnte die Ethanolphase abgenommen werden. Dieser Vorgang wurde drei Mal wiederholt. Die N-Glycane wurden dabei nicht präzipitiert. Durch Trocknung des Ethanols in der SpeedVac wurden die N-Glycane gewonnen.

Isolierung mittels C₁₈ Kartusche (Schnellmethode)

Nach der enzymatischen Freisetzung der N-Glycane wurde die Lösung mit den N-Glycanen und dem de-N-glycosylierte Protein mit Hilfe von Vakuum über eine HyperSEP C₁₈ 25 mg / 1 ml Cartridge (*Hyperthermosil*), gegeben. Dabei wurde das de-N-glycosylierte EPO an der Festphase gebunden. Zunächst wurde dazu die Festphase mit 3 mal 1 ml 90 % Acetonitril + 0,1 % TFA regeneriert und dreimal mit 1 ml 0,1 % TFA äquilibriert. Anschließend wurde die Kartusche langsam mit der Probe beschickt und mit 1 ml TFA gewaschen. Die aufgefangene Lösung mit den N-Glycanen wurde mit 2,5 % Ammoniak in deionisiertem Wasser neutralisiert. Die N-Glycane wurden durch Trocknung der Lösung in der SpeedVac gewonnen.

2.4.4 Entsalzung der N-Glycane

Die wässrigen N-Glycanlösungen wurden mit Hilfe einer 25 mg Hypercarb Graphitsäule entsalzt (Packer *et al.* 1998). Bei Lösungen, die Acetonitril enthielten, wurden nur Glasgefäße verwendet. Zum Entsalzen der N-Glycane wurde die Graphitsäule durch Äquilibrieren mit 2 ml 80% (v/v) Acetonitril aktiviert und zweimal mit je 1 ml Reinstwasser gewaschen. Danach wurden die N-Glycanlösung auf die Säule aufgetragen. Salze wurden durch dreimaliges Waschen der Säule mit je 1 ml Reinstwasser entfernt, und die gebundenen N-Glycane wurden mit 600 µl einer 40%igen (v/v) Acetonitril- und 0,38%igen (v/v) Ameisensäurelösung eluiert. Das Eluat (600 µl) wurde aufgefangen und sofort

mit 12,5% (v/v) Ammoniaklösung neutralisiert. Das N-Glycaneluat wurde in der SpeedVac bis zur Trocknung eingeengt.

2.4.5 Desialylierung der N-Glycane

Zur Desialylierung der N-Glycane wurde die N-Glycanlösung mit einem Endvolumen von 0,2 % TFA für 1 h bei 80 °C einer milden sauren Hydrolyse unterzogen, durch die die Sialinsäure abgespalten wurde. Anschließend wurden die N-Glycane in der SpeedVac getrocknet.

2.4.6 Analytische Trennung von N-Glycanen durch HPAEC PAD

Zur Trennung der N-Glycane wurde eine HPAEC PAD (*high pH anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection*) mit einer CarboPac™ PA1-Säule mit pelliculärem Latex-Anionenaustauscher mit funktionalisierten quaternären Ammoniumionen verwendet (Hardy and Townsend 1988). Das HPAEC PAD System ist zur Trennung von geladenen und neutralen Oligosacchariden geeignet und erlaubt auch die Trennung von Bindungsisomeren. Die Methode basiert auf der Ionisierung der Kohlenstoffhydrate bei einem pH Wert oberhalb von 12, die die chromatographische Trennung mit Anionenaustauschern ermöglicht. Dabei spielt die relative Acidität der Hydroxygruppen der Kohlenhydrate eine wesentliche Rolle. Bei unsubstituierten Hydroxygruppen lautet die Reihenfolge: hemiacetal>2-OH>6-OH>3-OH>4-OH. Die Substitution einer Hydroxygruppe bewirkt die Änderung der Acidität benachbarter Gruppen. Neben den unterschiedlichen pK_a -Werten der freien OH-Gruppen ist bei der Trennung auch die Zugänglichkeit der Oligosaccharidoxyanionen zu den funktionellen Gruppen der stationären Phase entscheidend. Allgemein eluieren kleinere Oligosaccharide früher als größere. Die gepulste amperometrische Detektion, die auf Redoxreaktionen der Kohlenhydrate an einer Goldelektrode beruht, erlaubt den Nachweis von Oligosacchariden im pmol-Bereich ohne vorhergehende Derivatisierung.

Um eine verbesserte Auftrennung der Kohlenhydrate zu erhalten, wurde die Gradiententechnik eingesetzt, wobei Natriumhydroxid und Natriumacetat in definierten Konzentrationen gemischt wurden. Geladene (*native*) N-Glycane wurden durch den in Tabelle 2.2 beschriebenen Gradienten analysiert, für

neutrale N-Glycane wurde der Gradient in Tabelle 2.3 verwendet. Die mobilen Phasen wurden mit Helium für 10 min entgast und das fertige Elutionsmittel unter Helium aufbewahrt.

Tabelle 2.2: Gradient zur Analyse nativer N-Glycane

Laufmittel A: 0,1 M NaOH Laufmittel B: 0,6 M NaOAc in 0,1 M NaOH		
Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	100	0
2	100	0
50	65	35
60	0	100
63	0	100
64	100	0
70	100	0

Tabelle 2.3: Gradient zur Analyse neutraler N-Glycane

Laufmittel A: 0,2 M NaOH Laufmittel B: 0,6 M NaOAc in 0,2 M NaOH		
Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	100	0
5	100	0
35	80	20
45	70	30
47	0	100
52	0	100
53	100	0
60	100	0

Zur Trennung wurde ein Probenvolumen von 20 µl injiziert; die Säule wurde zuvor 30 min mit 0,2 M NaOH äquilibriert. Die Flussrate betrug 1 ml / min. Die Analysen wurden bei einer konstanten Säulentemperatur von 25 °C durchgeführt. Die elektrochemische Detektion erfolgte durch Messung der Redoxpotentiale an einer Goldelektrode bei folgenden Detektorpotentialen und Pulsdauern: $E_1 = 50$ mV, $t_1 = 400$ ms, $E_2 = 750$ mV, $t_2 = 200$ ms, $E_3 = -150$ mV, $t_3 = 400$ ms. Die Datenaufzeichnung sowie die Auswertung erfolgte mittels Computerinterface und dazugehöriger Software (*Peaknet™ 6 Version 6.3 Chromatography Workstation*).

2.4.7 MALDI/TOF MS Analyse von N-Glycanen

Bei der MALDI/TOF MS (*Matrix assisted laser desorption ionization / time of flight mass spectrometry*) Analyse wird die Analytprobe mit einer Matrix kokristallisiert, die ein Absorptionsmaximum bei der benutzten Laserwellenlänge hat. Im Hochvakuum der Ionenquelle werden durch einen intensiven Impuls von UV-Laserstrahlung Ionen des intakten Analytmoleküls aus der Festkörperoberfläche in die Gasphase freigesetzt. Die Masse kann dann aus der Flugzeit der Ionen von der Ionenquelle zum Detektor berechnet werden (*Flugzeitmassenspektrometer*). Für ein Spektrum wurden im Durchschnitt 100 Einzelmessungen addiert. Aus den detektierten Massen lässt sich die Monosaccharidzusammensetzung der Glycane ableiten, woraus unter Berücksichtigung der bekannten Biosynthesewege der N-Glycane Strukturvorschläge abgeleitet werden können.

Die Analyse der N-Glycane erfolgte mit einem Bruker REFLEX™ MALDI/TOF MS Gerät. Etwa 1-10 pmol der Probe wurden in Matrixlösung (10 mg/ml 2,5-Dihydroxybenzoesäure, 10 % (v/v) Ethanol in deionisiertem H₂O) gelöst und auf einem Trägerblock eingetrocknet (*Ausgangsvolumen: 1 µl*). Durch Beschuss mit Licht eines 337 nm Stickstofflasers wurden die Molekülionen desorbiert. Die Masse der Molekül-Ionen wurde nach Beschleunigung auf 20 kV im linearen Modus oder nach Ablenkung im Reflektron durch einen *multi-channel plate* Detektor ermittelt. Das endgültige Massenspektrum wurde aus ca. 30 Einzelmessungen ermittelt und mit der vom Hersteller gelieferten Software erstellt.

2.4.8 Tryptischer Verdau von EPO zur Analyse der O-Glycane

Das getrocknete, de-N-glycosylierte EPO wurde in 100 mM Trispuffer pH 8,5 aufgenommen und je 10 µg Protein mit 0,2 µg Trypsin und 1 µM TPCK (*N-p-Tosyl-L-Phenylalanin-chromomethylketon*), das die chymotryptische Aktivität unterbindet, versetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Peptide wurden anschließend mit ZipTip®_{C18} Pipettenspitzen aus 50 µl der Verdauung isoliert. Dazu wurde das Säulenmaterial zunächst mit 10 µl einer Lösung aus 90% (v/v) Acetonitril und 0,1% (v/v) TFA regeneriert und anschließend dreimal mit je 10 µl 0,1% (v/v) TFA äquilibriert. Die Peptide wurden durch

wechselseitiges Auf- und Abpipettieren von 10 µl Probenlösung an die Festphase gebunden. Nach dreimaligem Waschen mit je 10 µl 0,1% (v/v) TFA wurden die Peptide mit 10 µl 70% (v/v) Acetonitril und 0,1% (v/v) TFA eluiert. Die Lösung der isolierten Peptide wurde durch Zugabe von 2,5 % (v/v) Ammoniaklösung neutralisiert und anschließend in der SpeedVac bis zur Trocknung eingengt. Der tryptische Verdau wurde in der SDS-PAGE überprüft.

2.4.9 MALDI/TOF MS Analyse von tryptischen Peptiden

Die MALDI/TOF MS Analyse erfolgte analog zu der der N-Glycane (*Kapitel 2.4.7*). Abweichend von der Matrixlösung für die N-Glycane wurde bei der Analyse der tryptischen Peptide eine Matrixlösung aus 10 mg / ml α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure in 70 % (v/v) Acetonitril mit 0,1 % (v/v) TFA verwendet.

2.4.10 ESI CID/TOF MS Analyse von Peptiden

Für die ESI (*electro spray ionisation*) Untersuchungen der Peptide wurde ein Finnigan MAT TSQ 700 Triple Quadrupol Massenspektrometer, das mit einer Finnigan Elektrospray Quelle ausgestattet war (*Finnigan MAT Corp., San Jose, CA, USA*), eingesetzt. Die Proben wurden in Methanol mit 2 % (v/v) Ameisensäure aufgenommen und bei einer Flussrate von 2 µl / min in die Elektrospray-Kammer injiziert. Die Beschleunigungsspannung betrug 4,5 kV.

Bei MS/MS Analysen wurden nach dem CID Modus (*collision induced dissociation*) die Ausgangsionen selektiv durch den ersten Analysator geleitet und dann in einer Kollisionszelle mit Argon (*kin. Energie 35 eV*) beschossen. Durch die entstandenen Fragmente wurde ein Masse-pro-Ladung-Spektrum erhalten, das dann mit der vom Hersteller gelieferten Software in ein Massenspektrum dekonvoluiert wurde.

2.4.11 Sequenzieller Enzymverdau der O-Glycanstruktur von IL2

Zum sequenziellen Enzymverdau der O-Glycanstruktur von IL2 wurden die Proteine inklusive dem IL2 aus dem Zellkulturüberstand durch Methanol-Chloroform-Fällung gewonnen und getrocknet. Zur Desialylierung wurden die Proteine in 70 µl Reinstwasser gelöst, mit 20 µl 0,5 M Natriumacetat, pH 5,0 versetzt und nach Zugabe von 5 µl Sialidase mit einer Aktivität von 100 U / ml auf 1 µg Protein über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch eine Methanol-

Chloroform-Fällung wurden die Proteine präzipitiert und anschließend getrocknet. Im nächsten Schritt wurden die Proteine mit β 1-2,3,4,6-N-Acetylglucosaminidase verdaut. Dazu wurden die Proteine in 50 mM Phosphatpuffer pH 5,0 aufgenommen und mit 80 mU / μ g Protein bei 37 °C über Nacht verdaut. Durch erneute Methanol-Chloroform-Fällung wurden die Proteine isoliert und anschließend getrocknet. Der Nachweis der einzelnen O-Glycan Abbaustufen des IL2s erfolgte mittels Western Blot mit anti-IL2-Antikörpern.

2.5 Berechnungen

2.5.1 Wachstumsgeschwindigkeit

Die Wachstumsgeschwindigkeit von Zellen berechnet sich nach folgender Formel:

$$\mu = \frac{\ln(x_t / x_0)}{(t - t_0)}$$

x_t : Zellkonzentration zum Zeitpunkt t

x_0 : Zellkonzentration zum Zeitpunkt t=0

t: Zeitpunkt der Analyse

t_0 : Zeitpunkt der Analyse des Ausgangswertes

2.5.2 Berechnung der hypothetischen Ladungszahl Z

Die von Hermentin et. al. definierte, hypothetische Ladungszahl Z berechnet sich aus dem Chromatogramm einer neutralen HPAEC PAD Analyse nach der folgenden Formel (Hermentin *et al.* 1996). Dabei stellt A jeweils den prozentualen Anteil der jeweiligen Strukturen dar.

$$Z = A_0 \cdot 0 + A_1 \cdot 1 + A_2 \cdot 2 + A_3 \cdot 3 + A_4 \cdot 4$$

mit:

- A_0 : neutrale Glycangruppe mit der Ladung 0 (Retentionszeit < 20 min)
- A_1 : monosialylierte Glycangruppe mit der Ladung 1 (Retentionszeit ca. 20-30 min)
- A_2 : disialylierte Glycangruppe mit der Ladung 2 (Retentionszeit ca. 30-38 min)
- A_3 : trisialylierte Glycangruppe mit der Ladung 3 (Retentionszeit ca. 38-45 min)
- A_4 : tetrasialylierte Glycangruppe mit der Ladung 4 (Retentionszeit ca. 45-54 min)

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Vergleichbarkeit von GA-EPO aus verschiedenen Produktionsprozessen

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, hängt die Wirksamkeit des EPOs entscheidend von der *in vivo* Halbwertszeit des Proteins ab, die von der Glycanstruktur, insbesondere dem Grad der vollständigen terminalen Sialylierung, determiniert wird. Ein weiterer Parameter für die *in vivo* Halbwertszeit ist die Antennarität, dargestellt im *glycan pattern*. Zur Untersuchung der Vergleichbarkeit von EPO aus verschiedenen Produktionen werden daher diese qualitätsrelevanten Parameter analysiert. Für die Durchführung der Prozessentwicklung werden zunächst die Analysetechniken für die qualitätsrelevanten Parameter definiert. Die geforderte Vergleichbarkeit des Produkts zum GA-EPO aus dem Airlift-Prozess soll durch diese Methoden verifiziert werden.

3.1.1 Bestimmung geeigneter Methoden für die Analyse der qualitätsrelevanten Parameter

Die Probenvorbereitung für die Glycananalytik ist mit ca. 2 Arbeitstagen sehr langwierig (*Proteinreinigung, Abspaltung der Glycane, Entsalzung der Glycane*). Für die Prozessentwicklung sollten die qualitätsrelevanten Parameter jedoch möglichst schnell bestimmt werden, um auf Veränderungen reagieren zu können. Eine geeignete Methode zur Bestimmung der qualitätsrelevanten Parameter muss daher mit möglichst kurzer Vorbereitungszeit ein aussagekräftiges Ergebnis hinsichtlich der qualitätsrelevanten Parameter liefern. Als Methoden zur Untersuchung des *glycan patterns* und der terminalen Sialylierung stehen die Analysen mittels nativer und neutraler HPAEC PAD sowie die MALDI/TOF MS (*positive Mode*) zur Verfügung (*vergl. Material und Methoden 2.4.6 und 2.4.7*). Diese Methoden stellen teils komplementäre, teils einander ergänzende Analysetechniken dar. Durch Gegenüberstellung der jeweiligen Analyseergebnisse soll beurteilt werden, ob die native HPAEC PAD Analyse als Methode mit der geringsten Probenvorbereitungs- und Analysenzeit alleine die für die Prozessentwicklung ausreichenden Ergebnisse zeigt und ob

die Schlussfolgerungen daraus mit den komplementären Ergebnissen aus den anderen Methoden übereinstimmen.

Dazu wurden ca. 400 µg GA-EPO aus dem Überstand einer Kultivierung durch Immunaффinitätschromatographie aufgereinigt, anschließend wurden die N-Glycane abgespalten, entsalzt und mit den verschiedenen Methoden (*vergl. Kapitel 2*) analysiert. Die Ergebnisse von einer Probe sind in Abbildung 3.1 auf Seite 48 dargestellt, es wurden drei verschiedene Proben auf diese Weise untersucht.

Bei den drei sich ergänzenden Analysen wurden übereinstimmend 86 ± 4 % tetraantennäre, 10 ± 2 % triantennäre und 3 ± 1 % diantennäre Strukturen detektiert. Ein Vergleich der Sialylierung ergibt ca. 88 % Gesamtsialylierung bei der nativen und ca. 91 % Gesamtsialylierung bei der neutralen HPAEC PAD Analyse. Bei der hier gezeigten MALDI/TOF MS Analyse der neutralen N-Glycane wird der Anteil der Sialinsäuren nicht analysiert. Das analysierte EPO ist hinsichtlich seines *glycan patterns* und seiner Sialylierung als qualitativ hochwertig einzustufen.

Die verschiedenen Analysemethoden weisen neben ihrer Komplementarität Unterschiede in Bezug auf ihren Informationsgehalt über die qualitätsrelevanten Parameter auf. Durch die Analyse der neutralen N-Glycane (*Abbildung 3.1, II*) mit der HPAEC PAD werden die triantennären N-Glycane in die beiden Isomere aufgetrennt, deren Antennen jeweils zwei Bindungen zu den beiden C2 Atomen der Mannosen aus dem *core* des N-Glycans aufweisen sowie die dritte Antenne entweder am C4 bzw. C6 Atom der jeweiligen Mannose gebunden hat. Diese Information ist während der Prozessentwicklung so lange unerheblich, wie der Gesamtanteil der triantennären N-Glycane gering ist und sich die Anteile der beiden Isomere nicht wesentlich ändern. Bei der nach der Prozessentwicklung notwendigen detaillierten Gesamtanalyse des GA-EPOs sollte jedoch dieser Aspekt ebenfalls berücksichtigt werden.

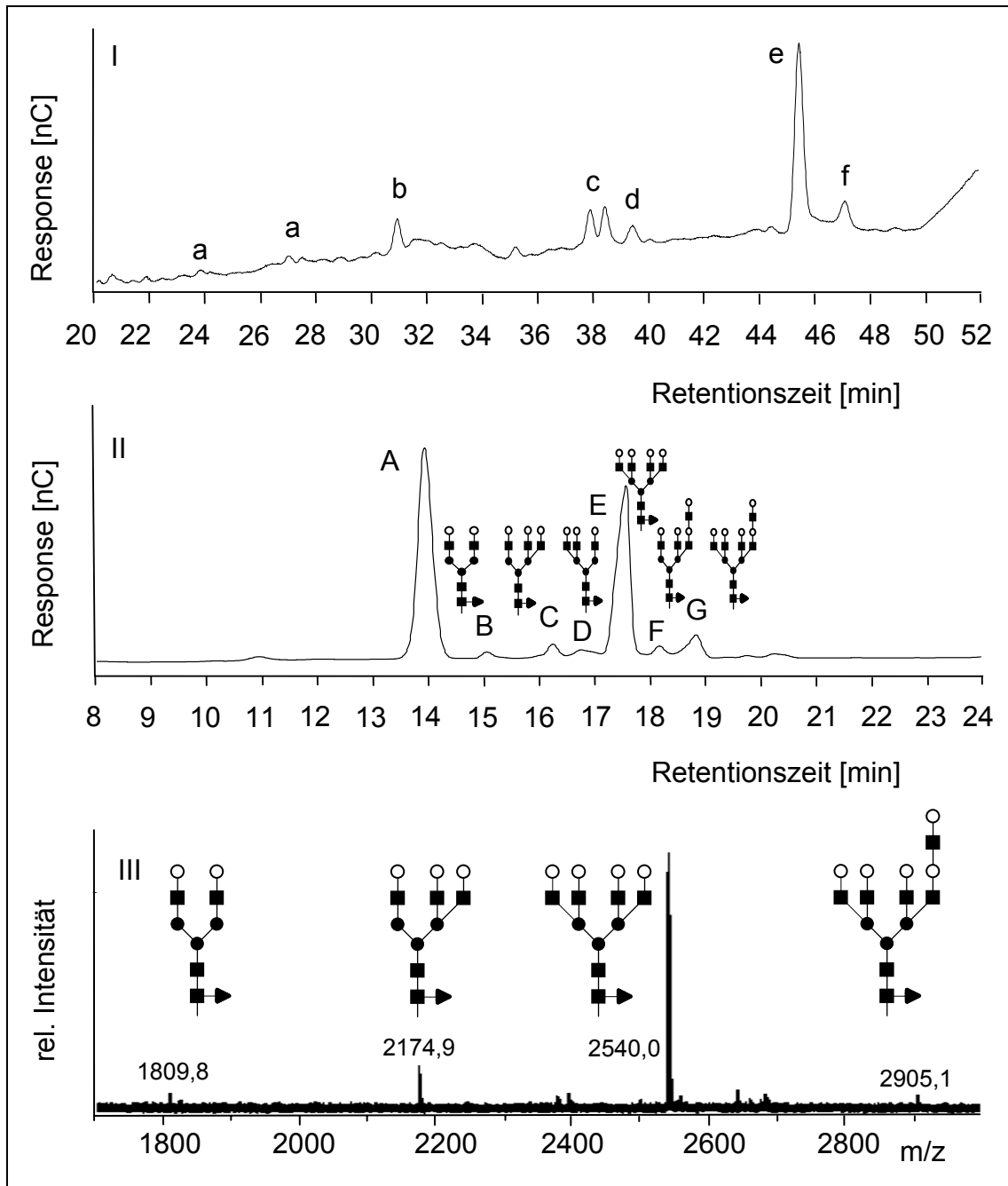


Abbildung 3.22: Komplementäre Methoden zur Strukturbestimmung: HPAEC PAD Analyse der nativen (I) und neutralen (II) GA-EPO N-Glycane sowie MALDI/TOF MS der neutralen N-Glycane (III). a: monosialylierte Glycane, b: disialylierte Glycane, c: trisialylierte tetraantennäre Glycane, d: trisialylierte triantennäre Glycane, e: tetrasialylierte tetraantennäre Glycane, f: tetrasialylierte tetraantennäre Glycane mit *repeat*; jeweils proximal α 1,6-fucosyliert A: Neuraminsäure, B: diantennär C: 2,2,4-triantennär, D: 2,2,6-triantennär, E: tetraantennär, F: triantennär mit Repeat, G: tetraantennär mit Repeat, jeweils proximal α 1,6-fucosyliert. Die in der Abbildung verwendeten Symbole stehen für folgende Monosaccharide: ■ GlcNAc, ► Fuc, ● Man, ○ Gal. Die sialylierten Glycanstrukturen (native HPAEC PAD (I)) sind in Tabelle 3.1 und 3.2 auf Seite 51 abgebildet.

Die MALDI/TOF MS Analyse der neutralen N-Glycane (III) ist als komplementäre Methode, die auf der Analyse einer anderen Produkteigenschaft basiert, zu Detektion von Strukturen wichtig, die bei gleichem Retentionsverhalten bei der HPAEC PAD Analyse nicht dieselbe Struktur wie der Standard darstellen. Bei den hier durchgeführten Analysen traten solche Strukturen nicht auf. Auch während dieser Prozessentwicklung für die Produktion von GA-EPO werden solche Strukturen nicht erwartet, die MALDI/TOF MS Analyse der neutralen N-Glycane ist jedoch Teil der abschließenden detaillierten Gesamtanalyse.

Die mit den drei verschiedenen Methoden gefundenen prozentualen Antennaritätsverteilungen weichen nur minimal voneinander ab. Auch der Prozentsatz der Gesamtsialylierung, der mit der nativen bzw. neutralen HPAEC PAD Analyse detektiert wurde, ist vergleichbar. Für die Routineanalytik während der Prozessentwicklung ist demnach die Analyse der nativen N-Glycane des GA-EPOs mittels der HPAEC PAD ausreichend.

3.1.1.1 Quantitative Bewertung des Grads der terminalen Sialylierung

Ein gebräuchlicher Parameter, der die Qualität von N-Glycanen mit Hilfe der nativen HPAEC PAD Analytik quantitativ darstellen soll, ist die so genannte hypothetische Ladungszahl Z (Hermentin *et al.* 1996). Hierbei werden die prozentualen Peakflächen aller Glycane, die tetrasialyliert sind, mit 4 multipliziert und mit den Peakflächen aller trisialylierten Glycane mit 3 multipliziert, addiert usw. (Siehe *Material und Methoden, Kapitel 2.5.2, Seite 45*). Für die einzelnen Antennaritäten werden dabei Retentionszeiträume festgelegt. Die resultierende Ladungszahl liefert ein Ergebnis zur Gesamtzahl der Sialinsäuren, gewichtet nach der Anzahl der Sialinsäuren pro N-Glycan. Gerade bei therapeutischen Proteinen wie EPO, die komplex glycosyliert sind und deren Oligosaccharidstrukturen viele Modifikationsmöglichkeiten (z. B. *Sulfatierungen*) aufweisen, ist die Anwendung der Z -Zahl zum Vergleich von Proben problematisch. Z. B. folgt aus der Modifizierung von tetraantennären tetrasialylierten Strukturen mit peripheren Fucosen, dass diese N-Glycane im Bereich der nicht peripher fucosylierten monosialylierten tetraantennären Glycane retentieren. Andere Modifikationen wie Sulfatierungen und Phosphorylierungen führen zu einer deutlichen Erhöhung der Retentionszeit

(Townsend *et al.*, 1989). Folglich eluieren diese Strukturen in einem Bereich, der nicht der Anzahl der Sialinsäuren des nicht modifizierten Glycans entspricht, so dass sich die Z-Zahl erhöht, ohne dass dies mit einer erhöhten Anzahl an Sialinsäuren zusammenhängt. Auch das Vorkommen von sog. Typ I Oligosacchariden mit Gal β 1-3GlcNAc Motiv verglichen mit Typ II Oligosacchariden mit Gal β 1-4GlcNAc Motiv führt zu einer Verfälschung der Z-Zahl, da die Typ I Strukturen deutlich später als die Typ II Strukturen eluieren. Zudem wird durch die Z-Zahl keine Aussage über die vollständige terminale Sialylierung und somit die biologische Aktivität getroffen.

Die Aussagekraft der Z-Zahl ist für die Prozessentwicklung von EPO zu ungenau, daher sollte eine geeignetere Quantifizierungsmöglichkeit bezüglich der terminalen Sialylierung und damit indirekt zu einer Aussage über die *in vivo* Halbwertszeit etabliert werden. Bei dieser Methode sollen die Peakflächen aller vollständig sialylierten Strukturen prozentual mit den Peakflächen aller anderen Glycane ins Verhältnis gesetzt werden. Die *in vivo* Halbwertszeit von EPO Präparaten mit niederantennären, vollständig terminal sialylierten Glycanstrukturen ist gering (*vergl. Einleitung*). Daher sollen alle Peaks von diantennären und monoantennären Glycanen zu den nicht vollständig sialylierten Strukturen gezählt werden. Peaks, die nicht eindeutig Glycanen zugeordnet werden können, werden ebenfalls den nicht vollständig terminal sialylierten Strukturen zugerechnet, damit sich eher ein zu niedriger als ein zu hoher Wert für den Anteil der vollständig terminal sialylierten Strukturen ergibt. Die Tabellen 3.1 und 3.2 auf Seite 51 zeigen die vollständig terminal sialylierten bzw. die partiell terminal sialylierten Strukturen.

Tabelle 3.1: Schematische Darstellung der vollständig terminal sialylierten Strukturen.

tetraanntenär tetrasialo mit prox. Fucose	tetraanntenär tetrasialo mit einem Repeat mit prox. Fucose	tetraanntenär tetrasialo mit zwei Repeats mit prox. Fucose	triantennär trisialo mit prox. Fucose	
				<ul style="list-style-type: none"> ◇ NeuAc ○ Gal ■ GlcNAc ● Man ▶ Fuc ◆ Glc

Tabelle 3.2: Schematische Darstellung der nicht vollständig terminal sialylierten bzw. niederantennären, vollständig terminal sialylierten Strukturen

tetraanntenär trisialo mit prox. Fucose	Beispiele disialylierter Glycane	Beispiele monosialylierter Glycane	
 	 	 	<ul style="list-style-type: none"> ◇ NeuAc ○ Gal ■ GlcNAc ● Man ▶ Fuc ◆ Glc

Um die neue Quantifizierungsmethode zu überprüfen, wurden zwei Proben von verschiedenen Kultivierungszeitpunkten miteinander verglichen. Die erste Probe wurde während der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen genommen, während die Zellen ideal versorgt waren (A). Die zweite Probe stammt aus dem Überstand von Zellen, die sich am Ende einer Kultivierung in der absterbenden Phase befanden (B). Mittels der nativen HPAEC PAD Analyse wurden aus diesen Proben Chromatogramme von N-Glycanen mit

hohem und mit niedrigem Anteil an terminal sialylierten Glycanen erstellt, um daraus eine quantitative Bewertung der terminalen Sialylierung abzuleiten.

Bei beiden Proben aus dem Zellkulturüberstand wurden die N-Glycane von jeweils ca. 100 µg GA-EPO abgespalten, aufgereinigt und mittels nativer HPAEC PAD analysiert (*vergl. Material und Methoden Kapitel 4.2*). Abbildung 3.2 zeigt die Chromatogramme.

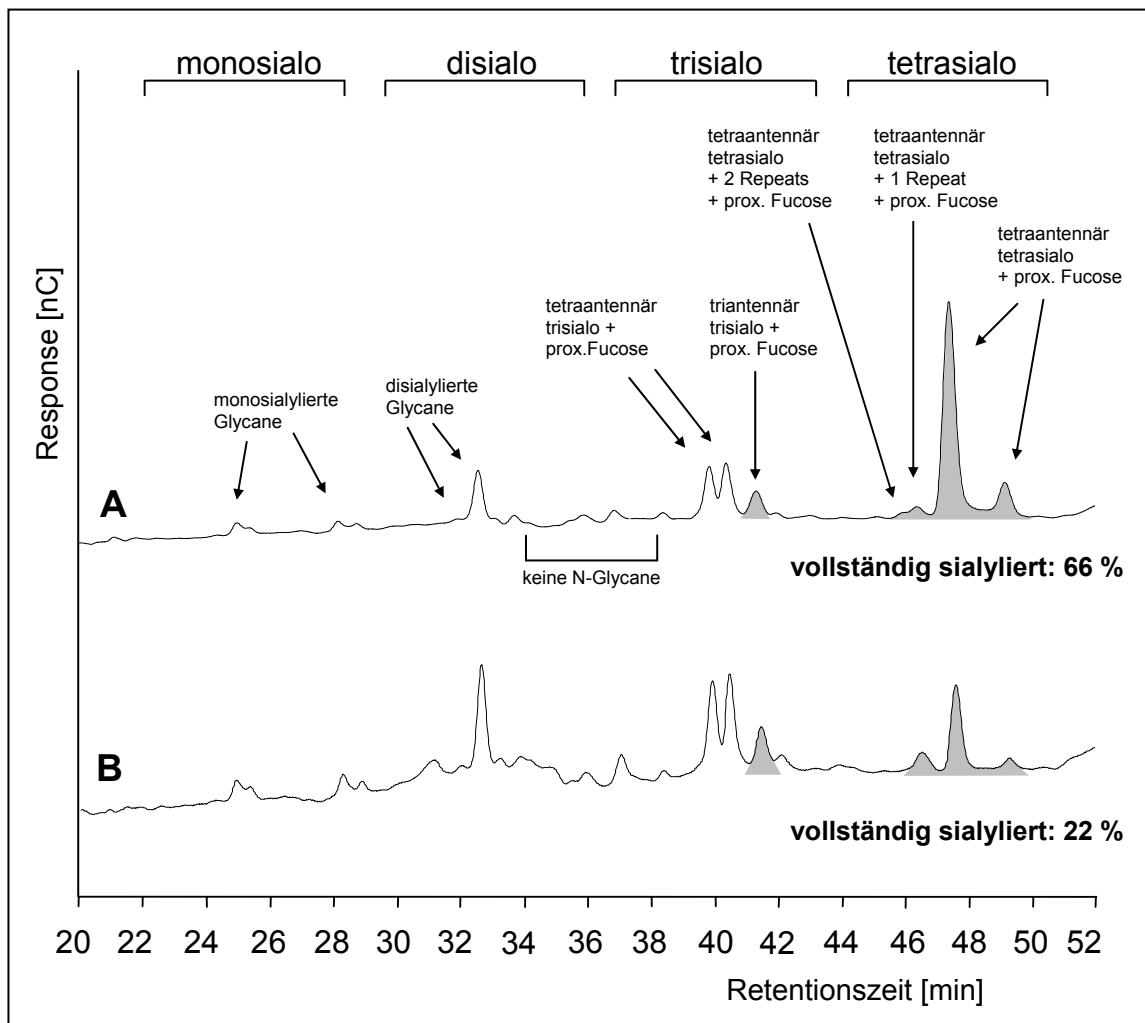


Abbildung 3.2: Vergleich zweier Proben mit hohem bzw. niedrigem Anteil an vollständig sialylierten N-Glycanen mittels nativer HPAEC PAD Analyse. Repräsentative Proben von GA-EPO N-Glycanen aus Zellkulturüberständen. Profil **A** zeigt die N-Glycane einer Probe mit hoch sialyliertem EPO (66 % *vollständig terminal sialyliert*). Profil **B** zeigt im Gegensatz dazu die N-Glycane einer Probe mit wenig sialyliertem EPO (22 % *vollständig terminal sialyliert*). Die grau hinterlegten Peaks lassen sich den vollständig terminal sialylierten Strukturen zuordnen, sie sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Die anderen beschrifteten Peaks stehen für nicht vollständig terminal sialylierte Glycane, die Strukturen sind in Tabelle 3.2 abgebildet.

Das *glycan pattern* und auch der Grad der terminalen Sialylierung der N-Glycane aus den beiden Proben unterscheiden sich signifikant. Die Bestimmung des Prozentsatzes der vollständig terminal sialylierten Glycane ergibt bei Probe A einen Anteil von 66 %. Probe B hingegen weist nur einen Anteil von 22 % auf. Probe A sollte demnach eine vergleichbar hohe, Probe B eine niedrige *in vivo* Halbwertszeit aufweisen.

Im Vergleich zur Quantifizierung der Sialinsäuren über die Z-Zahl liefert diese Methode eine genauere Gewichtung der Sialinsäuren in Bezug auf die biologische Aktivität, indem sie nur die vollständig terminal sialylierten N-Glycane positiv berücksichtigt. Da zudem nicht mit Retentionszeiträumen sondern die Peaks einzelner Strukturen, die über Standards zugeordnet werden, betrachtet werden, ergeben sich bei ungewöhnlichen Modifikationen oder auch Isomeren keine verfälschten Werte. Für die Durchführung dieser Arbeit wurde daher die oben vorgestellte Methode zur Quantifizierung der vollständig terminalen Sialylierung über das prozentuale Verhältnis der Peakflächen der untersialylierten und der vollständig terminal sialylierten N-Glycane herangezogen.

3.1.2 Untersuchungen zur Vergleichbarkeit von Produkten aus verschiedenen Kultivierungen

Für den Perfusionsprozess I wurden im Vergleich zum Airlift-Prozess sowohl das Produktionssystem, die Prozessführungsstrategie als auch das Medium geändert. Dabei handelt es sich um sogenannte *major changes* aus denen sich kausal die Notwendigkeit ableitet, die Vergleichbarkeit der Produkte vor und nach dieser Änderung zu zeigen. Da die Glycosylierung eine der wichtigsten und während der Prozessentwicklung eine der variabelsten Eigenschaft des EPOs ist, wurde hier die Vergleichbarkeit der N- und O-Glycane untersucht, auf andere Produkteigenschaften wurde nicht eingegangen.

Zunächst wird das GA-EPO aus dem Airlift-Prozess analysiert und mit dem GA-EPO aus dem Perfusionsprozess I verglichen. Die Ergebnisse der Glycananalytik des während der Entwicklung des neuen Produktionsprozesses produzierten GA-EPOs können mit diesen Untersuchungen verglichen werden.

3.1.2.1 Vergleichbarkeit der N-Glycanstrukturen aus verschiedenen Prozessen

Zur Untersuchung der Vergleichbarkeit wurden die im Airlift-Prozess bzw. dem Perfusionsprozess I produzierten N-Glycane des bereits aufgereinigten GA-EPOs verglichen. Dazu wurden jeweils 500 pmol N-Glycane der jeweiligen *drug substance* (DS) im nativen Zustand mit der HPAEC PAD analysiert. Außerdem wurden die N-Glycane aus dem *bulk harvest* (BH) aus zwei verschiedenen Produktionen aus dem Perfusionsprozess I mittels der nativen HPAEC PAD Analyse untersucht. Es wurden jeweils 200 µg EPO über Immunaффinitätschromatographie aus den Überständen gereinigt, die N-Glycane abgespalteten, entsalzt und ebenfalls im nativen Zustand mit der HPAEC PAD analysiert. Abbildung 3.3 auf Seite 55 zeigt die Chromatogramme dieser Analysen. Die einzelnen Glycanstrukturen sind durch charakterisierte Standards zugeordnet worden.

Die *glycan pattern* der aufgereinigten GA-EPO Proben aus dem Airlift-Prozess (1) und dem Perfusionsprozess I (2) sind sich ähnlich. Sie unterscheiden sich jedoch deutlich im Anteil der Gal β 1-3GlcNAc Bindung (*Peak A*), die anstelle der Gal β 1-4GlcNAc Bindung in einer Antenne von tetraantennären Glycanen auftritt, (vergleiche Abbildung 1.2, Seite 5). Die N-Glycane des GA-EPOs aus dem Airlift-Prozess weisen von diesem Bindungsisomer ca. 9 % der Gesamt-N-Glycane auf. Bei den N-Glycanen des GA-EPOs aus dem bisherigen Perfusionsprozess kommt diese Struktur vereinzelt, mit einem Prozentsatz von 2-3 % vor. Jedoch liegt der Anteil dieser Struktur oft unterhalb der Nachweisgrenze (*Daten nicht gezeigt*). Der Prozentsatz der vollständigen terminalen Sialylierung ist bei diesen beiden Proben sehr ähnlich. Bei den vorliegenden Proben des aufgereinigten GA-EPOs aus dem Airlift- Prozess ist bis auf das Bindungsisomer sowohl das *glycan pattern* als auch der Prozentsatz der vollständig terminal sialylierten Glycane vergleichbar.

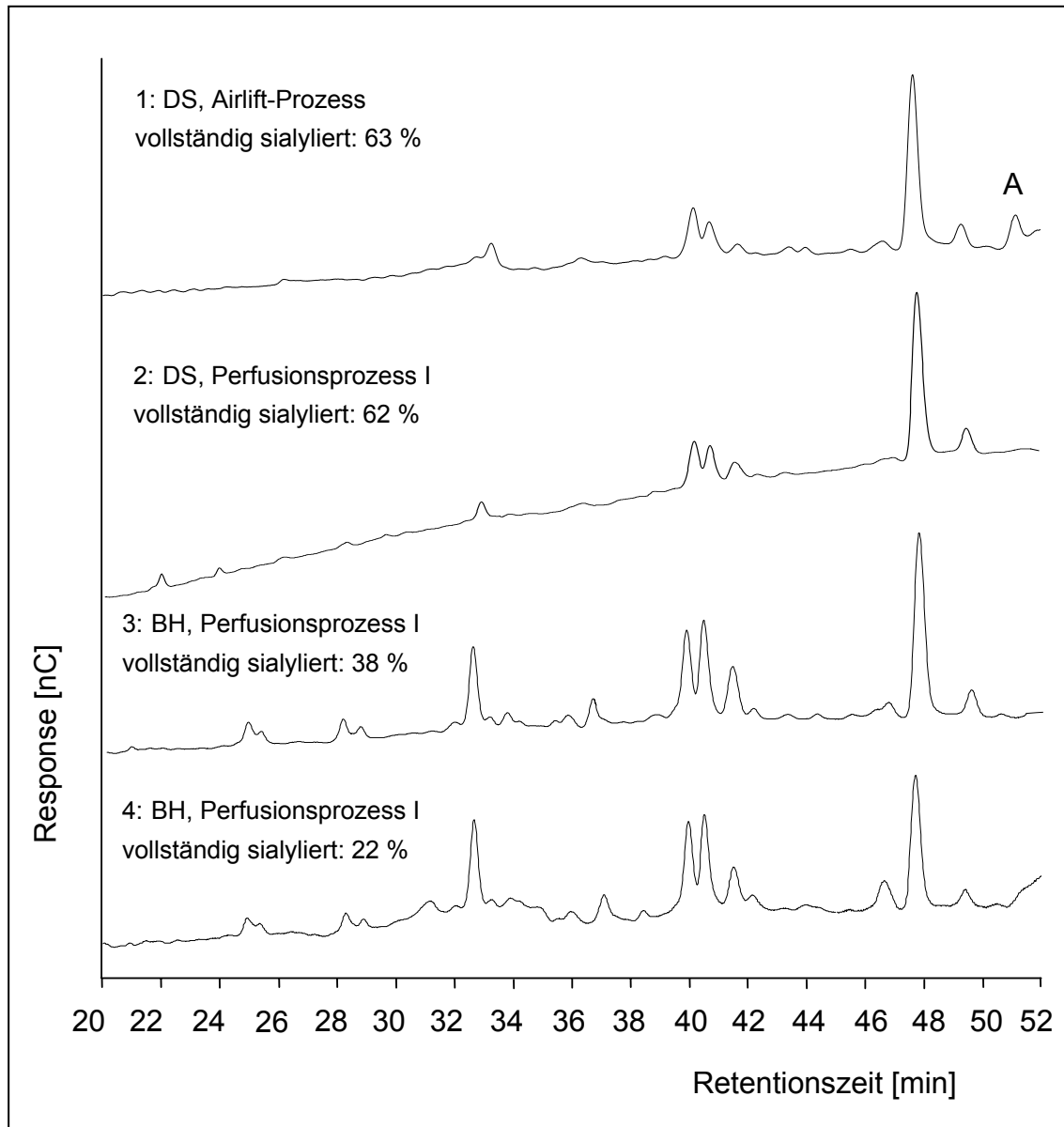


Abbildung 3.3: HPAEC PAD Analysen von nativen N-Glycanen des GA-EPOs aus dem Airlift-Prozess und dem Perfusionsprozess I. Analysen der nativen N-Glycane von aufgereinigtem GA-EPO produziert mit dem Airlift-Prozess (*drug substance*, DS, 1), von aufgereinigtem GA-EPO aus dem Perfusionsprozess I produziert mit SMIF 7 (*drug substance*, DS, 2) und aus zwei verschiedenen Batches des *bulk harvests* (BH) produziert mit SMIF 7 (3 + 4). Der mit A gekennzeichnete Peak repräsentiert die N-Glycanstruktur mit dem Bindungsisomer Gal β 1-3GlcNAc. Leichte Unterschiede in den Retentionszeiten der N-Glycane von aufgereinigtem und GA-EPO aus dem *bulk harvest* wurden durch unterschiedlichen Zeitpunkte der HPAEC PAD Analyse verursacht. Peak-Struktur Zuordnung: siehe Seiten 48 und 51.

Die in verschiedenen Aufarbeitungsläufen aufgereinigten GA-EPO Proben aus dem Perfusionsprozess I weisen signifikante Schwankungen hinsichtlich des Prozentsatzes der vollständigen terminalen Sialylierungen auf. Die Schwankungsbreite liegt zwischen 62 und 51 %. Derartige Unterschiede nach

der Aufarbeitung zeigen, dass der Prozess in sich nicht konsistent ist und daher schwer validierbar wäre. Das mit dem bisherigen Perfusionsprozess hergestellte GA-EPO ist aufgrund der Gal β 1-3GlcNAc Bindung eventuell nicht vergleichbar mit dem GA-EPO aus dem Airlift-Prozess. Die detektierte Bindungsvariante wurde schon von anderen Arbeitsgruppen analysiert. Tsuda et al. beschrieben einen signifikanten Anteil an tetraantennären N-Glycanen mit einer Gal β 1-3GlcNAc Bindung bei einer der Antennen sowohl bei urinärem (7 bzw. 11,2 % bei zwei unterschiedlichen Proben) als auch bei dem von ihnen mit BHK Zellen hergestellten rekombinanten EPO (8,8 %) (Tsuda et al. 1988). Bei der Analyse der Oligosaccharidstrukturen von BHK Zellen produziertem rekombinanten EPO fanden Nimtz et al. diese Struktur nicht (Nimtz et al. 1993). Die Analyse dieser Struktur beim GA-EPO, hergestellt mit den humanen HT1080 Zellen, unterstreicht, dass diese Struktur keine neue Qualität ist. Interessant ist eine Beobachtung von Gawlizek et al.: die N-Glycane der von ihnen untersuchten IL2-Mutante, die mit BHK Zellen hergestellt wurde, wiesen nur dann eine Gal β 1-3GlcNAc Bindung auf, wenn das Kulturmedium mit 15 mM NH $_4$ Cl supplementiert wurde (Gawlitzek et al. 1998). Daher wurde von ihnen angenommen, dass die Ausbildung dieses Bindungsisomers von den Kultivierungsbedingungen abhängt. Die Ammoniumionenkonzentration während der Produktion des GA-EPOs aus dem Airlift-Prozess ist nicht bekannt. Da es sich jedoch um einen Batchprozess handelt, kann die Möglichkeit einer erhöhten Ammoniumionenkonzentration nicht ausgeschlossen werden, auf die die Biosynthese der Zellen mit einer veränderten Biosynthese der N-Glycane reagieren kann.

Ob Bindungsvarianten mit unter 10 % Anteil die Vergleichbarkeit zweier Produkte zulassen, muss mit den für die Zulassung verantwortlichen Behörden abgestimmt werden. Da es sich bei dem Produkt aus dem Perfusionsprozess I um ein Fehlen von Strukturen mit dieser Bindungsvariante handelt, somit also den Patienten keine neuen Strukturen appliziert werden würden, sollten die beiden Produkte vergleichbar sein. Jedoch sind die teilweise auftretenden Unterschiede im Prozentsatz der vollständigen terminalen Sialylierung hinsichtlich der geforderten gleichen Profile von Qualität und Effektivität der zu vergleichenden Produkte problematisch.

Die Chromatogramme der beiden Proben aus dem *bulk harvest* des Perfusionsprozesses I (3 und 4, Abbildung 3.3 Seite 55) unterscheiden sich deutlich sowohl im *glycan pattern* als auch im Prozentsatz der vollständig terminalen Sialylierung. Auffällig sind die verschiedenen Prozentsätze der tetraantennären tetrasialylierten Glycane (38 % bei Probe 3, 22 % bei Probe 4). Im Bereich der disialylierten Glycane treten in Probe 4 prozentual sehr viele mit dieser Methode nicht näher bestimmbare Strukturen auf. Die Prozentsätze an vollständig terminal sialylierten Strukturen von 38 % (Probe 3) und 22 % (Probe 4) unterscheiden sich signifikant. Bei derartig unterschiedlichen Schlüsselintermediaten ist eine Aufarbeitung mit einem konsistenten Endprodukt und gleichzeitig möglichst hoher Ausbeute schwierig. Ziel der neuen Prozessentwicklung ist ein *bulk harvest* von konsistenter und höherer Qualität, durch die die Ausbeute erhöht wird. Zudem muss der Prozess validierbar sein.

Da der Prozentsatz der vollständig terminal sialylierten Strukturen des aufgereinigten GA-EPOs aus dem Airlift-Prozess bei ca. 60 % liegt, wird für die Entwicklung des neuen Produktionsprozesses die Grenze von mindestens 40 % für das *bulk harvest* festgelegt. Mit diesem Wert sollte die Ausbeute der Aufarbeitung deutlich höher ausfallen.

3.1.2.2 Vergleichbarkeit der O-Glycanstrukturen aus verschiedenen Prozessen

Vorangegangene Experimente haben hinweise darauf gegeben, dass bei GA-EPO zwei O-Glycosylierungsvarianten (*core 1 und core 2*) vorliegen können. Zur Untersuchung der Vergleichbarkeit der O-Glycanstrukturen aus verschiedenen Kultivierungen muss ebenfalls die für die Prozessentwicklung geeignete Analysenmethode bestimmt werden. Eine genaue Methode ist die Massenspektrometrie, jedoch ist diese sehr aufwändig. Da sich die beiden O-Glycosylierungsvarianten im Molekulargewicht unterscheiden, soll überprüft werden, ob bei einer SDS-PAGE / Western Blot Analyse der de-N-glycosylierten Proteine diese beiden Varianten getrennt darstellbar sind und diese Analyse somit ebenfalls zu einem für die Prozessentwicklung aussagefähigen Ergebnis führt. Zudem soll die O-Glycosylierung des GA-EPOs

aus dem Airlift-Prozess untersucht werden, um einen Vergleich mit den O-Glycanstrukturen des GA-EPOs aus der Prozessentwicklung vornehmen zu können.

Die O-Glycanstrukturen von im Airlift-Prozess und Perfusionsprozess I produziertem GA-EPO wurden analysiert, indem die N-Glycane mit Hilfe von Glycosidase F abgespalten und das mit DTT reduzierte Protein auf ein SDS Gel aufgetragen wurden. Im Airlift-Prozess wurde mit einer Batch-Strategie mit einem Medium auf DMEM Basis kultiviert, bei dem bisherigen Perfusionsprozess wurde SMIF 7/3 als Produktionsmedium für einen Prozess im Rührkessel verwendet. Abbildung 3.4 zeigt den Western Blot von GA-EPO, nativ und de-N-glycosyliert, produziert mit dem Airlift-Prozess und dem Perfusionsprozess I.

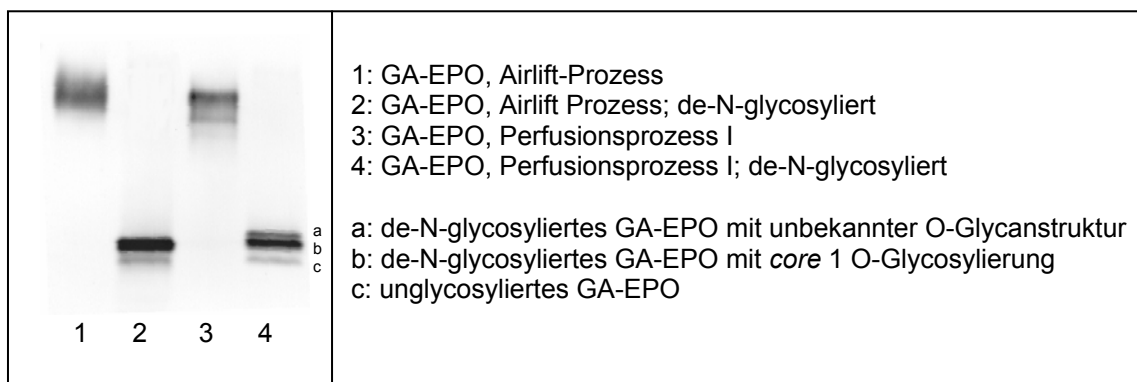


Abbildung 3.4: Analyse der O-Glycosylierung des GA-EPOs aus dem Airlift- und dem Perfusionsprozess I durch Western Blot. Gezeigt wird GA-EPO mit verschiedenen Glycosylierungsvarianten vor und nach Verdau mit N-Glycosidase F. Die Produktion des EPOs erfolgte im Airliftreaktor mit einem Medium auf DMEM Basis (*Spuren 1 + 2*) bzw. im Rührkessel mit SMIF 7/3 als Kulturmedium (*Spuren 3 + 4*). Je Spur wurden ca. 50 ng Protein aufgetragen.

Nach de-N-Glycosylierung des GA-EPOs, produziert mit dem Airlift-Prozess, wurden die beiden schon durch Voruntersuchungen bekannten Strukturvarianten, EPO mit core 1 O-Glycanstruktur (*b*, ca. 90 %) und nicht O-glycosyliertes EPO (*c*, ca. 10 %) detektiert (*Spur 2*). Das GA-EPO, produziert mit dem Perfusionsprozess I, weist diese beiden Strukturen ebenfalls auf (*b*, core 1 O-Glycanstruktur, ca. 60 % und *c*, nicht O-glycosyliert ca. 10 %). Zusätzlich wurde eine Bande des EPOs mit unbekannter O-Glycanstruktur detektiert (*a*, ca. 30 %).

Zur Aufklärung dieser Struktur wurden die O-Glycane beider Proben durch ESI-CID/TOF MS analysiert (interner Bericht, Dr. H. S. Conradt). Dabei stellte sich heraus, dass es sich bei der unbekannten Struktur um eine *core 2* O-Glycanstruktur handelt. Abbildung 3.5 zeigt die schon bekannte *core 1* O-Glycanstruktur und eine *core 2* Struktur (Schachter and Brockhausen 1989).

$ \begin{array}{c} \text{(NeuAc}\alpha\text{2)} \\ \downarrow \\ \text{6} \\ \text{(NeuAc}\alpha\text{2)} \rightarrow \text{3Gal}\beta\text{1} \rightarrow \text{3GalNAc}\alpha\text{1} \rightarrow \text{Ser}_{126} \end{array} $	<i>core 1</i> O-Glycosylierung
$ \begin{array}{c} \text{(NeuAc}\alpha\text{2)} \rightarrow \text{3Gal}\beta\text{1} \rightarrow \text{4GlcNAc}\beta\text{1} \\ \downarrow \\ \text{6} \\ \text{(NeuAc}\alpha\text{2)} \rightarrow \text{3Gal}\beta\text{1} \rightarrow \text{3GalNAc}\alpha\text{1} \rightarrow \text{Ser}_{126} \end{array} $	<i>core 2</i> O-Glycosylierung

Abbildung 3.5: Beispiele für Strukturvarianten der O-Glycosylierung. Oben: Struktur der *core 1* O-Glycanstruktur, unten: Struktur der *core 2* O-Glycosylierung

Die Auswertung der massenspektroskopischen Untersuchungen ergab für das GA-EPO produziert mit dem Airlift-Prozess einen Anteil von ca. 3 % an *core 2* O-Glycanstrukturen, die mit der Methode der SDS PAGE / Western Blot nicht detektierbar waren. Ca. 6 % des EPOs war nicht O-glycosyliert. Das restliche EPO zeigte eine *core 1* O-Glycanstruktur. Das im bisherigen Perfusionsprozess produzierte GA-EPO war gemäß dieser Analyse zu 33 % mit *core 2* O-Glycanstrukturen glycosyliert. Ca. 7 % des EPOs war nicht O-glycosyliert, die restlichen 60 % wiesen eine *core 1* O-Glycanstruktur auf. Nach dem Abgleich der SDS PAGE / Western Blot Analyse mit den detaillierten Ergebnissen aus der ESI-CID/TOF MS Analyse ist die elektrophoretische Analyse der O-Glycanheterogenität eine für die Prozessentwicklung geeignete Methode.

Bei der mit der SDS PAGE / Western Blot Analytik detektierten, unbekannten Struktur handelt es sich demnach nicht um eine qualitativ neue Form der O-Glycosylierung. Lediglich der quantitative Anteil ist beim GA-EPO produziert mit dem Perfusionsprozess I deutlich höher als beim Produkt aus dem Airlift-

Prozess. Die EPO-Formulierungen *Erypo 10000* und *Aranesp* der Fa. Amgen weisen die *core 2* O-Glycosylierungsvariante in Spuren ebenfalls auf (*persönliche Mitteilung Dr. H. S. Conradt*). Trotzdem sind die O-Glycosylierungen der beiden Produkte nicht vergleichbar, da im Produkt aus dem Perfusionsprozess I GA-EPO mit einer *core 2* Struktur in einer so viel höheren Konzentration vorliegt als im Produkt aus dem Airlift-Prozess. Das bedeutet, dass dem Patienten eine höhere Konzentration dieses EPOs verabreicht würde. Diese Konzentration ist in den klinischen Studien hinsichtlich der Sicherheit, Effektivität und Qualität des Produktes jedoch nicht berücksichtigt.

Da das Produkt aus dem Perfusionsprozess I nicht mit dem Produkt aus dem Airlift-Prozess vergleichbar ist, muss ein neuer Produktionsprozess entwickelt werden. Ein Ansatz ist dabei die Entwicklung eines neuen Mediums, da die Mikroheterogenität der Glycanstrukturen bei vorgegebener Zelllinie besonders von den Kultivierungsbedingungen abhängig ist. Nach der Prozessentwicklung muss der Prozentsatz der *core 2* O-Glycanstruktur gesenkt sein, sonst ist die Vergleichbarkeit des Produkts mit dem aus dem Airlift-Prozess nicht gegeben.

3.2 Medienentwicklung und –screening

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit besteht darin, ein ADF (*animal derived factor*) - freies Medium für den Prozess zu entwickeln, mit dem GA-EPO produziert wird, das vergleichbar zum GA-EPO aus dem Airlift-Prozess ist. Das für den Perfusionsprozess I benutzte Basalmedium ist SMIF 7/2; als Produktionsmedium wurde eine mit Aminosäuren und Energiequellen aufgestockte Version, SMIF 7/3, verwendet. Zur Untersuchung der Wachstums- und Produktionseigenschaften der Zellen in diesem Medium wurden Kultivierungen in Spinnerflaschen und als Batchkultivierung im Bioreaktor durchgeführt. Dabei wurden die Zellzahl, die Vitalität, die Morphologie, die Glucose-, Lactat-, Glutamin-, Glutamat- und Ammoniumionenkonzentration sowie die Produktivität, das *glycan pattern* und die vollständige terminale Sialylierung der N-Glycane des GA-EPOs analysiert.

Tabelle 3.3 fasst die wichtigsten Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammen.

Tabelle 3.3: Ergebnisse der Kultivierungen der HT1080 GA-EPO Zellen mit SMIF 7/2.

Untersuchte Parameter	Ergebnis	Folge
Morphologie	<ul style="list-style-type: none"> - apoptotische Zellen - Tendenz zur Aggregatbildung → keine <i>single cell suspension</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - gestörte Proteinbiosynthese - Nährstofflimitierung → kein homogenes Produkt
Kultivierung	<ul style="list-style-type: none"> - Auftauen, Zellanzucht und Kultivierung im Bioreaktor nicht konsistent - bei der Expansion Zentrifugation 2x wöchentlich notwendig 	<ul style="list-style-type: none"> - keine <i>batch-to-batch consistency</i> - Sicherheit der Kultivierung herabgesetzt
Proteinqualität	<ul style="list-style-type: none"> - schwankende <i>glycan pattern</i> und niedrige Anteile vollständig terminal sialylierter Glycane - 30 % <i>core 2</i> O-Glycanstrukturen 	<ul style="list-style-type: none"> - Ausbeuten nach Aufarbeitung gering und schwankend - keine Vergleichbarkeit mit GA-EPO aus dem Airlift-Prozess
Prozess	<ul style="list-style-type: none"> - Kultivierung inkonsistent - Proteinqualität inkonsistent 	- nicht validierbar

Die Folgen der Ergebnisse aus den Kultivierungen zeigen, dass eine weitere Medienentwicklung auf der Basis von SMIF7 nicht sinnvoll ist. Daher sollte zunächst ein neues, *animal derived factor* (ADF)-haltiges Standardmedium etabliert werden, das im Gegensatz zu SMIF 7 stabile Kultivierungseigenschaften aufweist, um Auswirkungen einer unstabilen Ausgangskultur auf die Entwicklung des ADF-freien Mediums auszuschließen. Auf Basis dessen soll ein ADF-freies Basalmedium entwickelt werden, das eine robuste Zellkultivierung bei schnellem Wachstum erlaubt und die Probleme der SMIF Medien nicht aufweist. Die wichtigsten Parameter während der gesamten Entwicklung sind die terminale Sialylierung, das *glycan pattern* sowie die O-Glycosylierung. Abbildung 3.6 zeigt schematisch das Vorgehen während der Medienentwicklung.

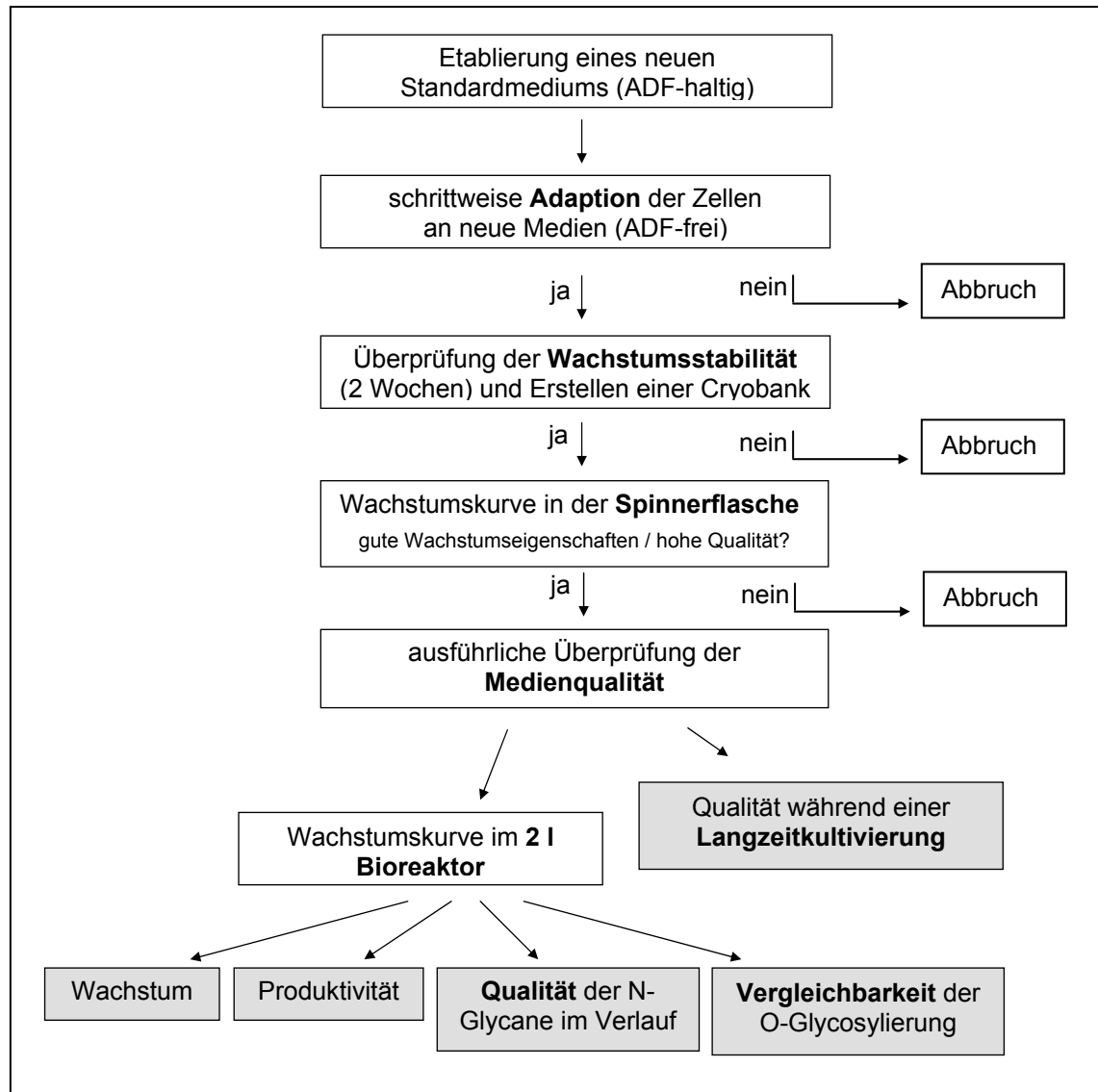


Abbildung 3.6: Schema zur Auswahl des Kultivierungsmediums. Die grau hinterlegten Parameter führen zur endgültigen Entscheidung über das im Weiteren zu benutzende Medium.

3.2.1 Vergleich von SMIF 7 mit dem neuen Standardmedium

Als neues Standardmedium wurde DMEM F12 (1:1) mit den Zusätzen Ethanolamin, Dexamethason, Putrescin, Hydrocortison, rek. hu. Insulin, Transferrin und BSA (*Fraktion V*) benutzt. Die Konzentrationen dieser Zusätze entsprachen denen in SMIF 7. Das Medium wird mit DMEM F12 PDM 3 bezeichnet. DMEM wird häufig zur Kultivierung von HT1080 Zellen benutzt (ATCC 2003; Chavarria *et al.* 2003). An SMIF 7 adaptierte und cryokonservierte Zellen ließen sich direkt mit dem neuen Standardmedium revitalisieren und kultivieren.

Für den Vergleich der Wachstumsparameter der Zellen in den verschiedenen Medien wurde jeweils ein Röhrchen mit in SMIF 7/2 cryokonservierten Zellen aufgetaut, für drei Tage in T-Flaschen mit den verschiedenen Medien kultiviert und in Spinnerflaschen überführt. Bei einer Zellzahl von mehr als $8 \cdot 10^5$ Zellen / ml wurden die Zellen auf $3 \cdot 10^5$ Zellen / ml verdünnt. Die Zellen wurden 22 Tage kultiviert. In Abbildung 3.7 ist der Vergleich zwischen den Gesamtzellzahlen, die sich jeweils für die Kultivierung mit DMEM F12 PDM 3 bzw. SMIF 7/2 aus dem Anfangsröhrchen ergeben haben, ab dem 2. Tag nach der Revitalisierung gezeigt. Der Versuch wurde zweimal reproduziert.

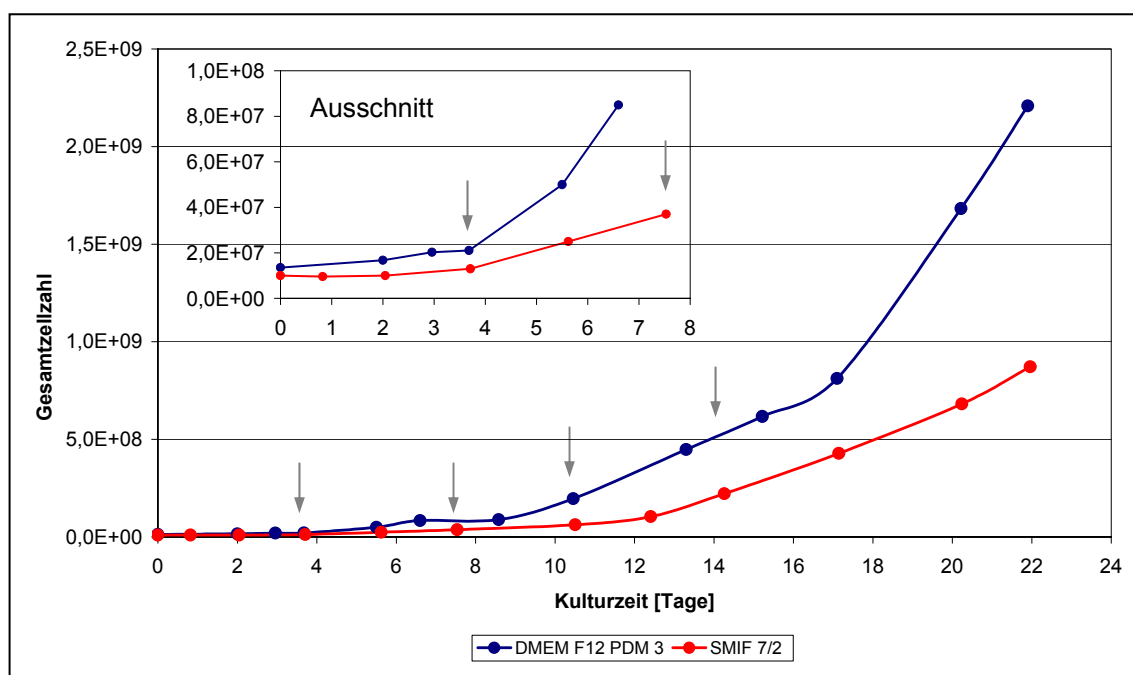


Abbildung 3.7: Vergleich der Zellanzucht von HT1080 GA-EPO Zellen kultiviert in DMEM F12 PDM 3 bzw. SMIF 7/2. Tag 0 bezieht sich auf den 2. Tag nach der Revitalisierung, den Tag der ersten Zellzahlbestimmung. Kultivierungszeitpunkte, zu denen die Kultur in SMIF 7/2 für die Passagierung abzentrifugiert werden musste, sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Die Analyse der Kultivierungen zeigt, dass die Zellen in DMEM F12 PDM 3 eine höhere Wachstumsgeschwindigkeit aufweisen. Vom Auftauen bis zu einer Gesamtzellzahl von ca. $8,5 \cdot 10^8$ Zellen betrug die durchschnittliche Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen in DMEM F12 PDM 3 $\mu = 0,01 \text{ h}^{-1}$, die der Zellen in SMIF 7/2 $\mu = 0,008 \text{ h}^{-1}$. Eine Gesamtzellzahl von $8 \cdot 10^8$ Zellen wurde in DMEM F12 PDM 3 bereits nach 17 Tagen erreicht, in SMIF 7/2 jedoch erst nach 22 Tagen. Eine längere Anzuchtphase vermindert die

Raum/Zeit Ausbeute eines Prozesses. Für die Kultivierung der Zellen in SMIF 7/2 sind zweimal wöchentlich Zentrifugationen zur Gewährleistung eines ausreichenden Mediumaustauschs notwendig (*in der Abbildung mit Pfeilen gekennzeichnet*). Da die Zellen in DMEM F12 PDM 3 nicht zentrifugiert werden müssen, besteht mit diesem Medium eine höhere Prozesssicherheit. Die mit DMEM F12 PDM 3 kultivierten Zellen wiesen während der gesamten Kultivierung eine höhere Vitalität (> 90 %) auf als die mit SMIF 7/2 kultivierten Zellen (80-90 %). Die Betrachtung der Wachstumsparameter zeigt die bessere Eignung des Mediums DMEM F12 PDM 3 für die Kultivierung von HT1080 GA-EPO Zellen.

Durch die hohe Vitalität der mit DMEM F12 PDM 3 kultivierten Zellen sowie deren Wachstum als *single cell suspension* sollten sich im Gegensatz zu den mit SMIF 7/2 kultivierten Zellen keine Probleme bei der Proteinbiosynthese ergeben, die zu einer erhöhten Mikroheterogenität bei der Glycosylierung führen können. Dies wurde untersucht, indem mittels Immunaффinitätschromatographie jeweils ca. 200 µg GA-EPO aus dem Überstand von Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase isoliert wurde. Dabei wurden Proben von Tag 17 (*DMEM F12 PDM 3*) und Tag 20 (*SMIF 7/2*) untersucht, um den eventuell zell- und produktschädigenden Einfluss der Zentrifugationen der in SMIF 7/2 kultivierten Zellen auszuschließen. Die N-Glycane des isolierten EPOs wurden enzymatisch abgespalten und aufgereinigt. Die Ergebnisse der sich anschließenden HPAEC PAD Analysen sind in Abbildung 3.8 auf Seite 65 gezeigt.

Der Anteil der vollständig terminal sialylierten N-Glycanen aus GA-EPO, das mit DMEM F12 PDM 3 produziert wurde, ist mit 53 % wesentlich höher als der des GA-EPOs kultiviert mit SMIF 7/2 (33 %) und entspricht der Spezifikation von mindestens 40 % vollständig terminal sialylierter Strukturen. Hinsichtlich der terminalen Sialylierung genügt dieses Medium daher den an ein neues Kultivierungsmedium gesetzten Ansprüchen.

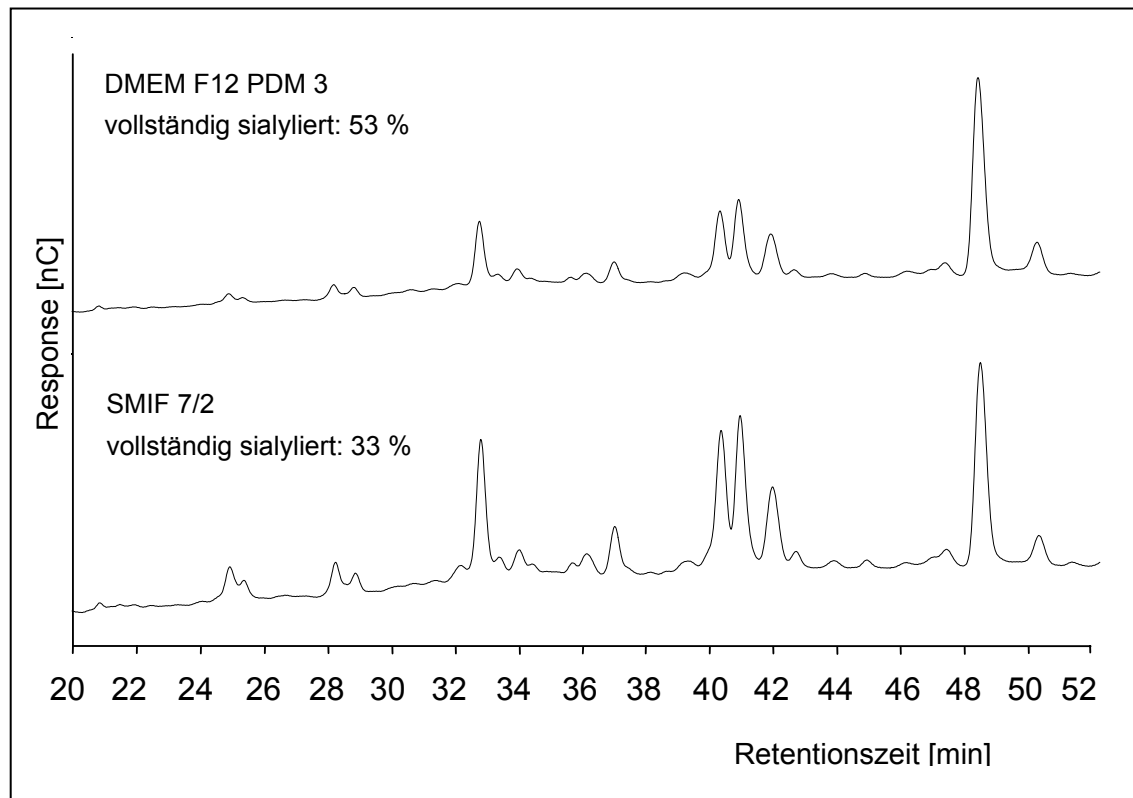


Abbildung 3.8: HPAEC PAD Analyse der nativen GA-EPO N-Glycane aus repräsentativen Überständen von Zellen kultiviert mit DMEM F12 PDM 3 (Tag 17) und SMIF 7/2 (Tag 20). Peak-Struktur Zuordnung: siehe Seiten 48 und 51.

Der Anteil der vollständig terminal sialylierten Strukturen ist bei GA-EPO aus dem Überstand (= *bulk harvest*) von Kulturen mit DMEM F12 PDM 3 höher als bei ca. einem Viertel der Proben der *drug substance* aus Kulturen mit SMIF 7. Für die Formulierung der *drug substance* mit biologisch hochaktivem EPO ist es notwendig, untersialyliertes EPO von der Gesamt-EPO-Produktion abzutrennen. Daher wird die Ausbeute nach der Aufarbeitung, wenn DMEM F12 PDM 3 als Kultivierungsmedium benutzt wird, deutlich höher sein als bei SMIF 7.

In DMEM F12 PDM 3 kultivierte Zellen bilden keine Gal β 1-3 GlcNAc Strukturen am GA-EPO aus (*vergl. Abb. 3.3, Seite 55*). Wie schon zuvor diskutiert, sollten sie jedoch trotzdem vergleichbar mit dem GA-EPO aus dem Airlift-Prozess sein. Bei der Betrachtung der O-Glycosylierung am Ser 126 des GA-EPOs kultiviert mit den Medien DMEM F12 PDM 3 sowie SMIF 7/3 zeigten beide ca. 30 % *core 2* Strukturen (*Western Blot Analysen nicht gezeigt*). Damit liegt dieser Prozentsatz auch beim GA-EPO aus Kultivierungen mit DMEM F 12 PDM 3 deutlich über dem von GA-EPO produziert im Airlift-Prozess.

Bei der Kultivierung der HT1080 GA-EPO Zellen im 2l Bioreaktor im Batchmodus mit DMEM F12 PDM 3 wurde beim Vergleich von fünf Ansätzen *batch-to-batch consistency* hinsichtlich der Revitalisierung, der Zellanzucht, des Zellwachstums, der Produktivität und der qualitätsrelevanten Parameter gezeigt. Die Produktivität während einer Wachstumskurve ist vergleichbar mit der Produktivität der Zellen kultiviert mit SMIF 7/2 (*Daten nicht gezeigt*).

Mit dem Medium DMEM F12 PDM 3 wurde somit das benötigte Standardmedium etabliert, das die im Vergleich zu SMIF 7 notwendigen und verbesserten Kultivierungseigenschaften aufweist. Dadurch sind die Voraussetzungen für die Entwicklung eines ADF-freien Basalmediums geschaffen.

3.2.2 Entwicklung des ADF freien Mediums DMEM F12 PDM 5.2

Bei dem Medium DMEM F12 PDM 3 handelt es sich nicht um ein ADF (*animal derived factor*)-freies Medium. Tierische Proteine können durch ihre Chargenvariabilität die Glycosylierung ganz unterschiedlich beeinflussen, so kann z. B. Serum den Grad der Sialylierung von Glycanen senken (Patel *et al.* 1992). Proteine tierischen Ursprungs im Produktionsmedium bergen evtl. die noch nicht erkannte Gefahr der Übertragung von Krankheiten auf den Menschen. Ein besonderes Beispiel hierfür ist fötales Kälberserum und die Möglichkeit, dass beim Menschen die Creutzfeld-Jacob-Krankheit durch Kontakt mit TSE ausgelöst werden könnte. Es ist deshalb für einen modernen Prozess erforderlich, ein Medium zu entwickeln, das frei von Proteinen ist, die aus tierischem Material gewonnen wurden. Die EMEA (*The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products*) fordert in ihrer „*Note for guidance on the use of Bovine Serum in the Manufacture of Human Biological Medicinal Products*“, alle Materialien tierischen Ursprungs möglichst nicht mehr zu verwenden, um die Prozesssicherheit zu erhöhen. Oft ist nicht bekannt, von welchen der nicht definierten tierischen Inhaltsstoffen die Kultivierung abhängt. Zudem müssen diese kostengünstig ersetzt werden. Die Schutzwirkung bestimmter Proteine z. B. gegen Scherstress im Bioreaktor muss ebenfalls durch Substanzen, die nicht tierischer Herkunft sind, ersetzt werden.

Zur Entwicklung eines ADF-freien Mediums auf Basis des DMEM F12 PDM 3 wurden die tierischen Proteine Transferrin und BSA aus der

Mediumformulierung herausgenommen. ADF-frei hergestelltes rec. hu. Insulin wurde in der Formulierung belassen. Verschiedene Ersatzstoffe für Transferrin und BSA wurden zu diesem Medium supplementiert. Dabei wurde bei allen Medien eine Mischung aus EDTA, Citrat und Fe(III)-Citrat (*zusammengefasst ECF*) sowie Aurintricarbonsäure (ATA) hinzugegeben, das die Apoptose in vielen Zelltypen unterdrückt (Batistatou and Greene 1991). Die HT1080 GA-EPO Zellen wurden an die verschiedenen Medien schrittweise adaptiert und ihre Wachstumsstabilität anschließend für zwei Wochen überprüft (*vergl. Abb.3.6 Seite 62*). Dabei gelten Zellen als nicht an ein Medium adaptierbar bzw. nicht wachstumsstabil, wenn die Vitalität unter 85 % sinkt und / oder die Verdopplungszeit mehr als drei Tage beträgt. Tabelle 3.4 zeigt die Übersicht über die getesteten Supplemente und die Ergebnisse von Adaption und Überprüfung. Jeder Versuch wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt.

Tabelle 3.4: Für die Kultivierung von HT1080 GA-EPO getestete Supplemente zu ADF-freien DMEM F12 PDM 3 Medium.

Zusätze zur Verbesserung der Kultivierbarkeit von ADF-freien DMEM F12 PDM 3					
Medium	adaptierbar?	Stabilität der Kultur	Medium	adaptierbar?	Stabilität der Kultur
¹ D 5.1	ja	-	² D 5.2 + Quest 1-6	ja	O
¹ D 5.2	ja	O	D 5.2 + Sojapepton	ja	O
¹ D 5.3	ja	-	D 5.2 + Prolifix	ja	O
¹ D 5.4	ja	-	D 5.2 + syn. Serum	ja	O
			³ D 5.2 + FCS	ja	+

¹ DMEM F12 PDM 5.x, x: Variation der ECF Konzentration

² Test sechs verschiedener Peptonformulierungen der Firma Quest

³ Vergleichskultur zum synthetischen Medium

+ / O / -: wachstumsstabil mit hoher Wachstumsgeschwindigkeit / wachstumsstabil /
nicht wachstumsstabil

Die HT1080 GA-EPO Zellen ließen sich an alle Medienformulierungen adaptieren. Die Überprüfung der Wachstumsstabilität zeigte jedoch, dass die meisten ECF-Konzentrationen nicht für eine Kultivierung geeignet sind.

Soll die Wirkung des Transferrins im Zellkulturmedium ersetzt werden, muss das passende Eisensalz eingesetzt werden (Merten 2002). Durch einen Chelator bleibt das Eisen in Lösung. Zudem unterdrückt der Chelator die Bildung freier Radikale (Inoue *et al.* 1996). Um das Transferrin zu ersetzen, wurde eine Mischung aus EDTA, Citrat und Fe(III)-Citrat untersucht. Eisencitrat wurde gewählt, da es die am häufigsten vorkommende physiologische Form des Eisens darstellt (Sarkar 1970). Bei EDTA handelt es sich um einen weit verbreiteten Chelator mit hoher Kapazität. Die Konzentration von Fe(III)-Citrat wurde variiert.

Den im Organismus hauptsächlich von Transferrin übertragenen Eisenionen kommt bei sich vermehrenden Zellen eine kritische Rolle als Cofaktor der ribonukleosidischen Diphosphat-Reduktase zu. Außerdem ist Eisen wichtig bei Sauerstofftransportvorgängen. Das Transferrin stabilisiert den Redoxstatus des Eisens (Harris *et al.* 1985) um z. B. Lipid-Peroxidationen im Plasma zu vermeiden (Gutteridge and Quinlan 1993). Die bei der Medienformulierung DMEM F12 PDM 5.2 gewählte Fe(III)-Citrat-Konzentration erwies sich als die geeignetste ($3 \mu\text{mol} / \text{l}$).

Albumin ist der wichtigste Bestandteil von Seren für die Zellkultur und wird zumeist als BSA zu vielen Serum-freien Medien supplementiert. (Barnes and Sato 1980). Um auch das BSA zu ersetzen, wurden verschiedene pflanzliche Peptone, hier das Sojapepton sowie die verschiedenen Peptonformulierungen der Fa. Quest als Zusätze zu dem Medium DMEM F12 PDM 5.2 getestet. In der Literatur sind viele erfolgreiche Kultivierungen mit pflanzlichen Peptonen beschrieben (Keay 1977; Merten *et al.* 1999). Bei der Kultivierung der HT1080 GA-EPO Zellen ergaben diese Substanzen als BSA Ersatz gegenüber der ersatzlosen Absetzung keinen Vorteil. BSA wirkt als Transporter für Substanzen wie Lipide, Hormone, lösliche Aminosäuren, Peptide u.s.w.. Durch seine hohe Affinität zu den genannten Stoffen ist es kompliziert zu reinigen und liegt daher wahrscheinlich nicht als reiner Mediumzusatz vor. Zudem legen Ergebnisse von Keenan *et al.* von Versuchen mit hochreinem, in Hefen produziertem Albumin

nahe, dass die wachstumsstimulierenden Effekte nicht alleine vom Albumin ausgehen, sondern wahrscheinlich von assoziierten Molekülen (Keenan *et al.* 1997). Dies könnte der Grund sein, aus dem Medien mit Peptonen keine Kultivierungsvorteile zeigen.

Die verschiedenen, von BSA eventuell transportierten Substanzen sollen ADF-frei ersetzt werden. Die einzigen nicht-tierischen, sondern synthetischen Lipidquellen sind Ethanolamin (Murakami *et al.* 1982) und Dexamethason, ein synthetisches Analogon zum Cholesterol (Litwin 1989). Beide Substanzen sind schon Bestandteil der Mediumformulierung DMEM F12 PDM 3 und verbleiben in unveränderter Konzentration in der Medienformulierung für das ADF-freie Medium. Hier wurde versucht, die anderen, transportierten Substanzen durch die Peptone zu ersetzen. Die mit ihnen supplementierten Medien boten den Zellen jedoch keinen Vorteil gegenüber dem nicht supplementierten Medium hinsichtlich der Wachstumsstabilität und wurden daher bei weiteren Versuchen nicht mehr eingesetzt.

Synthetisches Serum der Fa. Medicult (*Dänemark*) und die Mischung aus synthetischen Proteinen „Prolifix“ der Fa. Bio Media (*Frankreich*) mit dem Pflanzenmitogen GCR 1003 als Hauptbestandteil, die als Serumersatz entwickelt wurden, wurden als zusätzlicher Hilfsstoff für die ADF-freie Kultivierung getestet. Beide Zusätze ergaben keine Verbesserung der Wachstumsstabilität der HT1080 GA-EPO Zellen gegenüber dem nicht weiter supplementierten Medium DMEM F12 PDM 5.2, daher wurden diese Stoffe nicht in die weiteren Versuche mit einbezogen.

Das ADF-freie Medium DMEM F12 PDM 5.2, das dem DMEM F12 PDM 3 ohne BSA und Transferrin jedoch mit ATA und ECF entspricht, erwies sich als das geeignetste Medium, das nach diesem Ansatz getestet wurde. Abbildung 3.9 zeigt einen Vergleich der Wachstumskurven von Zellen, kultiviert in DMEM F12 PDM 3 bzw. DMEM F12 PDM 5.2, in Spinnerflaschen. Dazu wurden die Zellen aus einer Vorkultur, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befand, abzentrifugiert und mit einer Anfangszellzahl von ca. $3 \cdot 10^5$ Zellen / ml inokuliert. Täglich wurde eine Probe genommen, mit der die Zellzahl, die Vitalität, die Morphologie, die Glucose-, Lactat-, Glutamin-, Glutamat- und Ammoniumionenkonzentration sowie die Produktivität analysiert wurden. Das

Medium wurde nicht ausgetauscht. Der Versuch wurde als Doppelbestimmung durchgeführt.

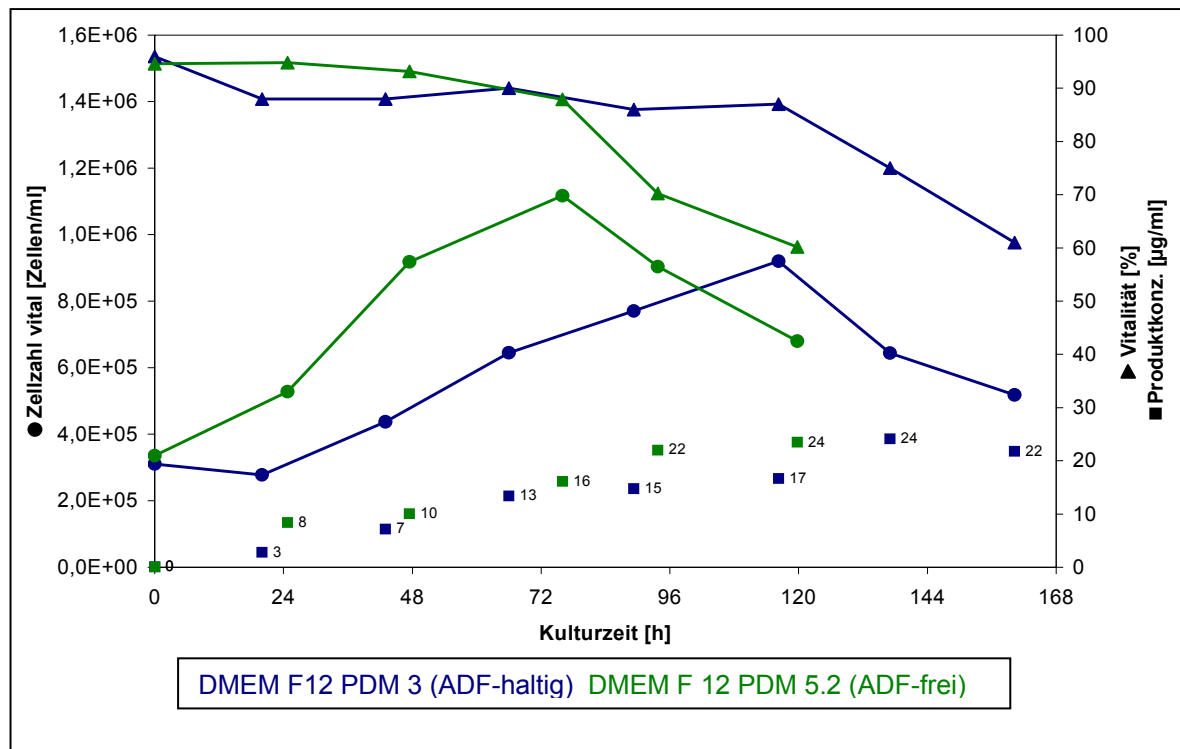


Abbildung 3.9: Wachstumseigenschaften von HT1080 GA-EPO Zellen in verschiedenen Medien. Kultivierung mit DMEM F12 PDM 3 (ADF-haltig) und DMEM F12 PDM 5.2 (ADF-frei).

Die in DMEM F12 PDM 5.2 kultivierten Zellen wiesen eine kürzere Lag-Phase und eine größere durchschnittliche Wachstumsgeschwindigkeit bis zum Erreichen des Zellmaximums auf ($\mu_{DMEM F12 PDM 3} = 0,0094 h^{-1}$, $\mu_{DMEM F12 PDM 5.2} = 0,017 h^{-1}$). Die maximale Zellkonzentration war höher als bei den in DMEM F12 PDM 3 kultivierten Zellen und sie wurde früher erreicht (DMEM F12 PDM 3: $9,2 \cdot 10^5$ Zellen / ml nach 116 h,; DMEM F12 PDM 5.2: $11,2 \cdot 10^5$ Zellen / ml nach 76 h). Die Vitalität beider Kulturen war bei der ersten Messung nach Erreichen der maximalen Zellzahl unter 80 %. Beide Kulturen wiesen eine maximale Produktkonzentration in der gleichen Größenordnung auf ($24 \mu g / ml$). Die maximale Produktkonzentration trat bei der Kultur in DMEM F12 PDM 5.2 44 h früher auf als bei der Kultur in DMEM F12 PDM 3. Eine kürzere Generationszeit der Zellen kultiviert in DMEM F12 PDM 5.2 gegenüber den Zellen kultiviert in DMEM F12 PDM 3 wirkt sich positiv auf die Raum/Zeit Ausbeute aus, da auch die Produktkonzentration vergleichbar ist.

Trotz der wahrscheinlich vorliegenden Nährstofflimitierung nach ca. 76 h, die durch das Fehlen einer stationären Phase deutlich wird, ist dieses Medium, d.h. speziell der Ersatz der tierischen Proteine durch ECF, prinzipiell für die Kultivierung von HT1080 GA-EPO Zellen geeignet. Es zeigt sogar ein gegenüber der Variante mit tierischen Proteine Vorteile in der Wachstumsgeschwindigkeit.

Wichtig für die Beurteilung der Medien sind zusätzlich die qualitätsrelevanten Parameter. Um diese zu analysieren, wurden jeweils ca. 200 µg GA-EPO aus den Zellkulturüberständen vom Zeitpunkt der letzten Probenahme während des exponentiellen Zellwachstums mittels Immunaффinitätschromatographie aufgereinigt. Die N-Glycane wurden mit N-Glycosidase F enzymatisch vom Protein abgespalten und gereinigt. Die HPAEC PAD Diagramme sind in Abbildung 3.10 gezeigt.

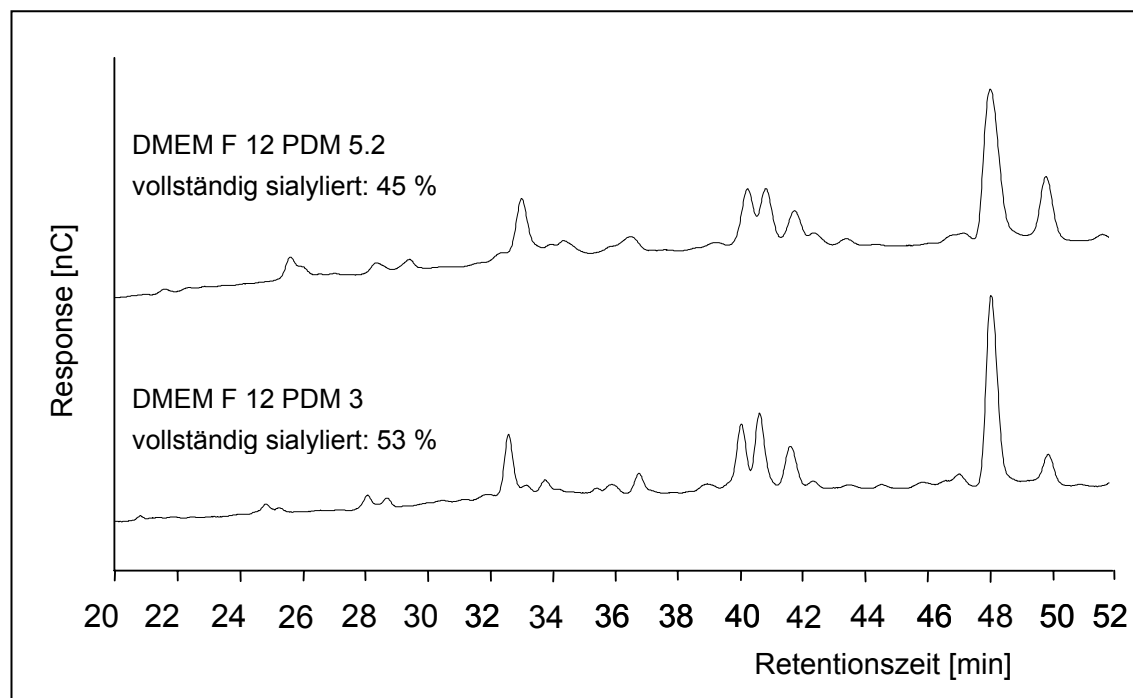


Abbildung 3.10: HPAEC PAD Analysen der nativen GA-EPO N-Glycane aus den Zellkulturüberständen der in Abbildung 3.6 dargestellten Wachstumskurven in Spinnerkulturflaschen. Analysiert wurden jeweils Zellkulturüberstände vom Zeitpunkt der letzten Probenahme während des exponentiellen Zellwachstums von Zellen, die mit DMEM F12 PDM 3 bzw. mit DMEM F12 PDM 5.2 kultiviert wurden. Peak-Struktur Zuordnung: siehe Seiten 48 und 51.

53 % der N-Glycanstrukturen von GA-EPO, produziert von Zellen, die in DMEM F12 PDM 3 kultiviert wurden, sind vollständig terminal sialyliert. Die N-Glycane

des GA-EPOs, produziert von in DMEM F12 PDM 5.2 kultivierten Zellen, weisen einen geringeren Anteil an vollständig terminal sialylierten Strukturen auf (45 %), erfüllen jedoch die Spezifikation von mindestens 40 %. Das N-Glycanpattern ist vergleichbar mit dem Pattern der N-Glycane des GA-EPOs aus dem Airlift-Prozess.

Die geringe Vitalität von 80 % zum Zeitpunkt der höchsten Produktkonzentration kann sich negativ auf die Sialylierung des Produktes auswirken, da Sialidasen von lysierten Zellen ins Medium abgegeben werden und bei entsprechender Stabilität und Inkubationszeit Sialinsäuren abspalten könnten. Diesen Effekt haben Gramer & Goochee für CHO Zellen zeigen können (Gramer and Goochee 1993). Der Grad der Abspaltung der Sialinsäuren von den Glycanstrukturen des Produkts hängt u.a. vom Prozentsatz der kompetitiven Glycoproteinen im Medium ab. Sialidasen sind daher bei der Kultivierung in ADF-freiem Medium besonders kritisch für die Produktqualität, da dieser Prozentsatz sehr viel kleiner ist. Im ADF-haltigen Medium DMEM F12 PDM 3 beträgt die Konzentration des Glycoprotein Transferrin 1 µg / ml und ist daher jedoch kein wirksamer Kompetitor zum bis zu 25 fach höher konzentriertem EPO. Die Gründe für den unterschiedlichen Sialylierungsgrad sind nicht klar.

Das Zellwachstum mit DMEM F12 PDM 5.2 ist nicht immer stabil. Ca. 10 % der Kulturen müssen aufgrund zu geringen Wachstums abgebrochen werden. Daher kann dieses Medium trotz kurzer Generationszeit noch nicht als Basismedium eingesetzt werden. Aus diesem Grund wurden kommerziell erhältliche ADF-freie Medien gescreent und entweder pur oder als Supplement zu DMEM F12 PDM 5.2 verwendet.

3.2.3 Screening von Fertigmedien kommerzieller Hersteller und Medienmischungen

Ein alternativer Ansatz zur Etablierung eines ADF-freien Mediums ist die Benutzung von Fertigmedien. Die Zellen sollen ausgehend von der Kultivierung in DMEM F12 PDM 3 an neun verschiedene Fertigmedien kommerzieller Hersteller adaptiert werden. Für die Adaption wurde DMEM F12 PDM 3 bei den Passagierungen schrittweise durch das neue, ADF-freie Kultivierungsmedium ersetzt. Die Überprüfung der Wachstumsstabilität der Zellen mit den

verschiedenen Medien wurde gemäß dem Schema in Abbildung 3.6 Seite 62 für zwei Wochen durchgeführt. Die qualitätsrelevanten Parameter des GA-EPOS, das mit den verschiedenen Medien produziert wurde, wurden in Proben aus der exponentiellen Wachstumsphase sowie am Ende der Kultivierung analysiert. Alle Versuche wurden mindestens als Doppelbestimmungen durchgeführt. Tabelle 3.5 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

Tabelle 3.5: Ergebnisse der Adaption, der Stabilität des Zellwachstums kommerziell erhältlicher Medien und Medienmischungen sowie Beurteilung der qualitätsrelevanten Parameter.

Kommerziell erhältliche Medien				Mischungen aus DMEM F12 PDM 5.2 (D 5.2) und kommerziellen Medien			
Medium	adaptierbar?	Stabilität der Kultur	Vollständige terminale Sialylierung	Medium	adaptierbar?	Stabilität der Kultur	Vollständige terminale Sialylierung
MAN-PF2	nein	-	n.a.	10 % CD Hybridoma	ja	+	< 40 %
Cell Mab Animal Comp. free	ja	-	n.a.	50 % Pro CHO 4 CDM	ja	+	> 50 %
Cell Mab Serum free	ja	-	n.a.	10 % Pro CHO 4 CDM	ja	+	> 50 %
Opti Pro SFM	ja	O	< 40 %	50 % CHO#6k	ja	+	> 50 %
Ultra Culture	ja	O	< 40 %	25 % CHO#6k	ja	+	> 50 %
Ultra Doma PF	ja	O	< 40 %	10 % CHO#6k	ja	+	> 50 %
CD Hybridoma	ja	O	< 40 %				
Pro CHO 4 CDM	ja	O	> 40 %				
CHO#6k	ja	+	> 50 %				

+ / O / -: gute / schwankende / keine Stabilität des Zellwachstums in der Kultur

MAN-PF2 :

Wiederholte Adaptionsversuche der Zellen an dieses Medium waren nicht erfolgreich. Nach jeweils 4 Passagen war die Vitalität der Zellen auf unter 80 % gesunken. Im Verlauf der Kultivierung sank zudem die Produktkonzentration.

CellTM Mab Medien:

An die Medien **CellTM Mab Animal Component-free** und **CellTM Mab Serum free** konnten die Zellen erfolgreich adaptiert werden. Jedoch sanken die Zellvitalitäten während der zweiwöchigen Überprüfung der Wachstumsstabilität auf unter 80 % und die Generationszeiten verlängerten sich von ca. 26 h auf 70 h. Hohe Ammoniumionkonzentrationen von 11 mM könnten einen der Gründe hierfür darstellen. Bei Kultivierungen der HT1080 GA-EPO Zellen in geeigneten Medien steigt die Ammoniumkonzentration bei der Batchkultivierung nicht über 3 mM, dabei konnte keine Wachstumsinhibierung festgestellt werden. McQueen gibt für Hybridoma Zellen eine wachstumsinhibierende Ammoniumkonzentration von 10 mM an, während 3 mM Ammonium keinen Einfluss auf das Zellwachstum haben (McQueen 1991). Die Ammoniumionkonzentration, bei der ein cytotoxischer Effekt auftritt, ist jedoch zelllinienabhängig (Hassell *et al.* 1991).

Opti Pro, Ultra Culture, Ultra Doma PF:

Die Adaption der Zellen an diese Medien war erfolgreich. Bei der Überprüfung der Wachstumsstabilität waren die Vitalitäten bei allen Medien kontinuierlich über 90 %. Ca. 20 % aller Kulturen von jedem dieser Medien zeigten jedoch erheblich erhöhte Generationszeiten (*bis zu 70 h*), die zum Abbruch dieser Kultivierungen führten. Die Anteile vollständig terminal sialylierter N-Glycane des GA EPOs aus Kultivierungen mit den Medien Opti Pro, Ultra Culture und Ultra Doma PF waren im Vergleich zu den Anteilen, die mit dem Medium DMEM F12 PDM 5.2 erreicht wurden, gering (< 30 %) und entsprachen nicht der Spezifikation von mindestens 40 % vollständig terminal sialylierter Strukturen.

CD Hybridoma:

An das Medium CD Hybridoma ließen sich die Zellen problemlos adaptieren. 20 % der Kulturen zeigten jedoch eine verlängerte Generationszeit bis zu 50 h. Während der Überprüfung der Wachstumsstabilität zeigte sich, dass die Produktivität der Zellen, die mit diesem Medium kultiviert wurden, immer weiter abnahm. Die Klone sind demnach in diesem Medium nicht stabil. Da der Anteil vollständig terminal sialylierter N-Glycane unterhalb der Spezifikation lag, wurde dieses Medium nicht weiter getestet.

Pro CHO4 CDM:

Die Adaption an das Medium Pro CHO4 CDM verlief erfolgreich. Während der Überprüfung der Wachstumsstabilität fiel jedoch auf, dass 10 bis 20 % der Kulturen eine erhöhte Generationszeit von bis zu 60 h aufweisen. Zudem zeigten die Zellen, die mit Pro CHO 4 CDM kultiviert wurden, eine deutliche Aggregatbildung. Da der Anteil der vollständig terminal sialylierten N-Glycane trotzdem der Spezifikation entsprach, wurde mit den Zusätzen Dextransulfat, DNase, Accumax und Cell Syntacher (*Fa. Cambrex*) versucht, die Sphäroide aufzulösen. Die Supplementierungen von jeweils 5 % Accumax, Cell Syntacher und 20 und 100 µg / ml DNase über 3 Wochen ergaben keine Verbesserungen. Konzentrationen zwischen 0,94 bis 3,75 µg / ml Dextransulfat ergaben ebenfalls keine Verbesserung, eine Supplementierung mit 3,75 µg / ml führte zum Absterben der Kultur. Trotz der fehlgeschlagenen Versuche gegen die Sphäroidbildung wurde das Medium aufgrund der guten Produktqualität, die mit diesem Medium erreicht wurde, zu 50 % und zu 10 % dem Medium DMEM F12 PDM 5.2 beigemischt und getestet.

CHO#6k:

Die Adaption der Zellen an das Medium CHO#6k wurde, da es sich um ein Mediensystem der *Fa. Cambrex* handelt, erfolgreich mit den bereits an Pro CHO 4 CDM adaptierten Zellen durchgeführt. Die Überprüfung der Wachstumsstabilität für zwei Wochen war erfolgreich. Es gab im Gegensatz zum Ausgangsmedium keine Tendenz zur Sphäroidbildung. Zellen kultiviert mit CHO#6k zeigten in keiner Kultur eine Verringerung der Generationszeit. Der Anteil vollständig terminal sialylierter N-Glycane war vergleichbar mit dem der

N-Glycane des GA-EPOs produziert mit DMEM F12 PDM 3 (54 bzw. 53 %, *Daten nicht gezeigt*). Da die Kosten für ein kommerzielles Medium, das speziell für die ADF-freie Kultivierung entwickelt wurde, bei ca. 50 € pro Liter liegen, wurden Mischungen von 50, 25 und 10 % mit DMEM F12 PDM 5.2 (ca. 10 € pro Liter) getestet.

Beimischungen zu DMEM F12 PDM 5.2: **10 % CD Hybridoma, 50 % Pro CHO 4 CDM, 10 % Pro CHO 4 CDM, 50 % CHO#6k, 25 % CHO#6k und 10 % CHO#6k**

Die Zellen ließen sich problemlos an alle Medienmischungen adaptieren. Auch die Überprüfung der Wachstumsstabilität war bei allen Medien erfolgreich und der Anteil an vollständig terminal sialylierten N-Glycanen des produzierten GA-EPOs entsprach den Spezifikationen. Die Zellen in CD Hybridoma (10 %) und DMEM F12 PDM 5.2 (90 %) zeigten im Gegensatz zu den Zellen in reinem CD Hybridoma keine abnehmende Produktivität mehr, jedoch lag der Anteil an vollständig terminal sialylierter N-Glycane außerhalb der Spezifikation. Die Tendenz der Zellen in Pro CHO 4 CDM zur Sphäroidbildung nahm mit sinkendem Prozentsatz des Pro CHO 4 CDM ab. Bei einer Supplementierung von 10 % war die Sphäroidbildung jedoch immer noch stärker als im reinen DMEM F12 PDM 5.2.

Aufgrund der Wachstumsstabilität der HT1080 GA-EPO Zellen und der Produktqualität des produzierten GA-EPOs wurden folgende Medien dem weiteren Auswahlprozess unterzogen: DMEM F12 PDM 5.2, CHO#6k, Pro CHO4 CDM (10 %) / DMEM F12 PDM 5.2 (90 %) und CHO#6k (10 %) / DMEM F12 PDM 5.2 (90 %). Da die Zellen mit allen Medienmischungen ein gutes Wachstumsverhalten zeigten, wurde aus Kostengründen jeweils die Mischung mit dem geringsten Prozentsatz des Spezialmediums benutzt. Aus diesen Kulturen wurden ADF-freie Zellbänke angelegt.

3.2.4 Untersuchung des Kultivierungsverhaltens von HT1080 GA-EPO Zellen in Spinnerkulturen

Für die weiteren Untersuchungen zur Ermittlung eines Basalmediums wurden Wachstumskurven in Spinnerflaschen mit den oben genannten Medien

durchgeführt. DMEM F12 PDM 3 wurde als Standardmedium ebenfalls untersucht. Die Wachstumskurven wurden in Doppel- bzw. Dreifachbestimmungen durchgeführt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse befindet sich in Tabelle 3.6 auf Seite 82.

Zur Aufnahme der Wachstumskurven wurden die adaptierten Ausgangszellen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, komplett abzentrifugiert. 120 ml Zellsuspension mit einer Anfangszell-dichte von 2,5 bis $3 \cdot 10^5$ Zellen / ml wurden in 500 ml Spinnerflasche kultiviert. Während des Versuchs wurden täglich 7 ml Suspension entnommen. Folgende Parameter wurden gemessen, von denen nur die relevanten in den Abbildungen dargestellt wurden: Zellzahl (*vital und gesamt*), Glucose-, Lactat-, Glutamin-, und Ammoniumionkonzentration, pH Wert, Produktkonzentration und der Anteil der vollständig terminal sialylierten N-Glycane. Für jedes Medium wird in Abbildung 3.11 auf Seite 78 eine Wachstumskurve gezeigt.

Die mit **DMEM F12 PDM 3** kultivierten Zellen wuchsen nach einer Lag-Phase von ca. 24 h mit einer durchschnittlichen Wachstumsgeschwindigkeit $\mu = 0,0094 \text{ h}^{-1}$ auf die maximale Lebendzellzahl von $9,2 \cdot 10^5$ Zellen / ml nach 116 h. Die End-Glucosekonzentration lag bei 2,16 g / l. Die Lactatkonzentration stieg bis auf max. 1,49 g / l. Die Erfahrungen aus der Stammhaltung legen keine Schädigung der Kultur bei dieser Lactatkonzentration nahe. Die höchste Produktkonzentration von 24 μg / ml wurde nach 137 h erreicht. Zu diesem Zeitpunkt lag die Vitalität allerdings schon bei 75 %.

Zellen, die mit **DMEM F12 PDM 5.2** kultiviert wurden, wuchsen innerhalb von 76 h mit einer durchschnittlichen Wachstumsgeschwindigkeit von $\mu = 0,016 \text{ h}^{-1}$ auf eine maximale Zellzahl von $1,1 \cdot 10^6$ Zellen / ml. Die Glucosekonzentration sank bis zum Ende der Kultivierung bis auf 0,47 g / l. Der Anstieg der Lactatkonzentration bis auf 1,89 g / l am Ende des Versuchs könnte sich negativ auf die Kultivierung auswirken. Die maximale Produktkonzentration lag bei 24 μg / ml bei einer Vitalität von nur noch 60 %.

Die mit **CHO#6k** kultivierten Zellen wuchsen mit einer durchschnittlichen Wachstumsgeschwindigkeit von $\mu = 0,008 \text{ h}^{-1}$ auf die maximale vitale Zellzahl von $9,66 \cdot 10^5$ Zellen / ml nach 137 h. Der Endwert der Glucosekonzentration war 1,3 g / l. Die Lactatkonzentration stieg bis auf 1,54 g / l. Die maximale

Produktkonzentration von 44 µg / ml wurde nach 160 h bei einer Vitalität von 86 % erreicht. Eine hohe Produktkonzentration von 37 µg / ml konnte mit diesem Medium bei Vitalitäten über 90 % erreicht werden.

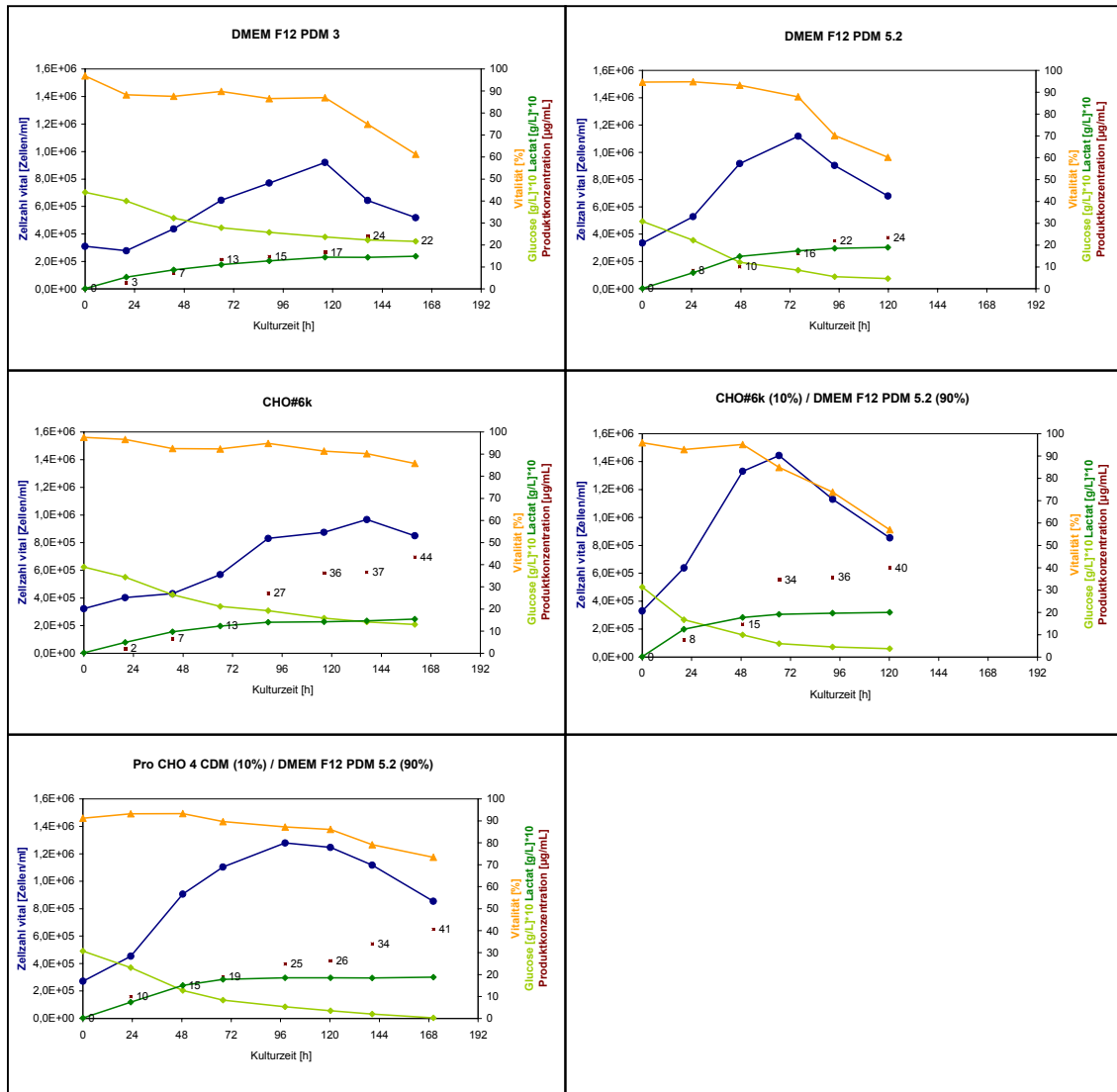


Abbildung 3.11: Wachstumseigenschaften von GA-EPO HT1080 Zellen kultiviert als Wachstumskurven in Spinnerflaschen mit verschiedenen Medien. Verwendete Medien: DMEM F12 PDM 3, CHO#6k, Pro CHO4 CDM (10%) / DMEM F12 PDM 5.2 (90%), DMEM F12 PDM 5.2 und CHO#6k (10%) / DMEM F12 PDM 5.2 (90%). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Wachstumskurven lässt sich Tabelle 3.6 (Seite 82) entnehmen.

Die Zellen, die mit **CHO#6k (10%) / DMEM F12 PDM 5.2 (90 %)** kultiviert wurden, wuchsen mit einer durchschnittlichen Wachstumsgeschwindigkeit von $\mu = 0,023 \text{ h}^{-1}$ innerhalb von 67 h auf eine maximale Zellzahl von $1,4 \cdot 10^6$ Zellen / ml. Die Glucosekonzentration fiel während der Kultivierung bis auf 0,37 g / l. Die Lactatkonzentration stieg während des Versuchs beträchtlich

und betrug am Ende der Kultivierung 2,0 g / l. Es wurde eine maximale akkumulierte Produktkonzentration von 40 µg / ml erreicht. Die Vitalität betrug 85 %, als eine Produktkonzentration von 34 µg / ml gemessen wurde.

Die mit **Pro CHO 4 CDM (10%) / DMEM F12 PDM 5.2 (90%)** kultivierten Zellen wuchsen innerhalb von 98 h auf $1,3 \cdot 10^6$ Zellen / ml. Dabei betrug die durchschnittliche Wachstumsgeschwindigkeit $\mu = 0,013 \text{ h}^{-1}$. Die Glucosekonzentration lag bereits nach 68 h bei 0,83 g / l, die Glucose wurde bis zum Ende der Kultivierung komplett verbraucht. Im Verlauf der Kultivierung stieg die Lactatkonzentration auf 1,85 g / l. Es wurde eine maximale Produktkonzentration von 44 µg / ml bei einer Vitalität von 73 % erreicht.

Die maximal erreichte Zellkonzentration der Kulturen mit ADF-freiem Medium war um 2 bis $5 \cdot 10^5$ Zellen / ml höher als die der Zellen kultiviert in DMEM F12 PDM 3. Mit den Medien DMEM F12 PDM 5.2, CHO#6k (10%) / DMEM F12 PDM 5.2 (90 %) und CD-Hybridoma (10%) / DMEM F12 PDM 5.2 (90%) wurde sie jedoch 22 bis 70 h früher erreicht als mit den übrigen Medien.

Von den Kulturen mit einem hohen Zellwachstum hat die Kultur mit DMEM F12 PDM 5.2 (90 %) / CHO#6k (10 %) als Kulturmedium die höchste maximale Produktkonzentration. Beides kombiniert ergibt die günstigste Raum/Zeit-Ausbeute.

Für die vollständige terminale Sialylierung der N-Glycane eines biotechnologischen Produktes aus Säugetierzellen ist die Vitalität der Zellen wichtig, da Glycosidasen von abgestorbenen / permeablen Zellen ins Medium abgegeben werden. Zudem sollte die Belastung der Ernte mit *host cell proteins* möglichst gering sein, um die Aufarbeitung kostengünstig gestalten zu können. Bei einem Batchprozess wird der Erntezeitpunkt in Abhängigkeit von der Produktmenge und der Produktqualität, in diesem Fall den qualitätsrelevanten Parametern vollständige terminale Sialylierung und *glycan pattern*, optimiert. Erstrebenswert ist demnach eine hohe Vitalität bei hoher Produktkonzentration. Beim Erreichen der maximalen Produktkonzentration war die Vitalität der Kulturen schon auf unter 90 % gefallen.

Die N-Glycane des GA-EPOs aus den einzelnen Kultivierungen wurden mittels HPAEC PAD analysiert. Das EPO wurde durch Immunaффinitätschromatographie aus dem Überstand der Kulturen gereinigt. Die N-Glycane wurden anschließend enzymatisch abgespalten und isoliert. Abbildung 3.12 zeigt die *glycan pattern* der N-Glycane aus der exponentiellen Wachstumsphase der Kultivierungen mit den verschiedenen Medien. Zu sehen sind die Chromatogramme der Analyse der nativen N-Glycane mit der HPAEC PAD.

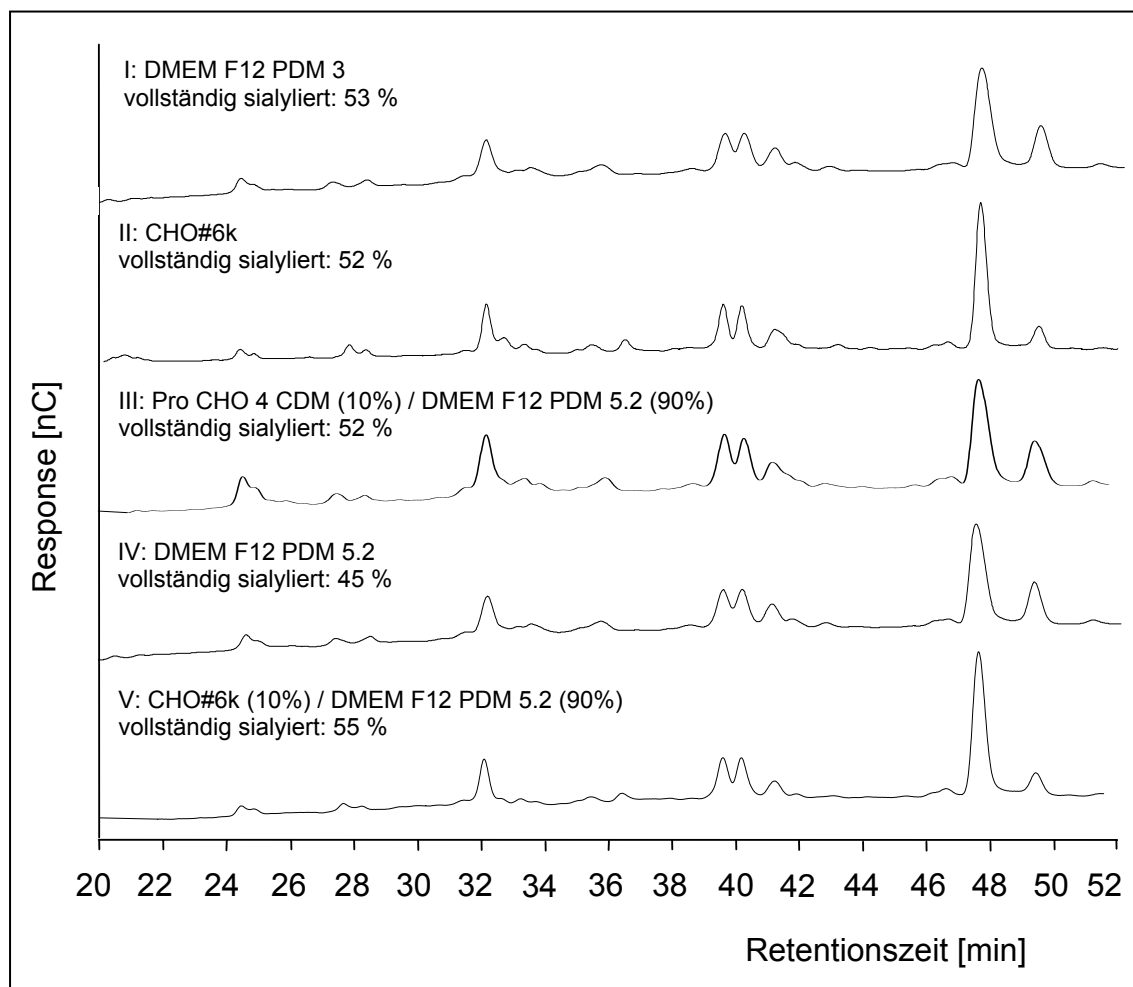


Abbildung 3.12: HPAEC PAD Analysen der nativen GA-EPO N-Glycane aus Zellkulturüberständen von den in Abbildung 3.11 dargestellten Wachstumskurven in verschiedenen Medien. I: DMEM F12 PDM 3, II: CHO#6k, III: Pro CHO 4 CDM (10%) / DMEM F12 PDM 5.2 (90%), IV: DMEM F12 PDM 5.2, V: CHO#6k (10%) / DMEM F12 PDM 5.2 (90%). Die Probennahme erfolgte während der exponentiellen Phase. Peak-Struktur Zuordnung: siehe Seiten 48 und 51.

Die N-glycan pattern des GA-EPOs, das während der exponentiellen Phase mit allen Medien produziert wurde, sind miteinander und mit den Glycanen aus dem Airlift-Prozess vergleichbar. Die Anteile der vollständig terminal sialylierten

Glycane liegen bei diesen Medien innerhalb der Spezifikation von mindestens 40 %.

Neben dem *glycan pattern* und dem Anteil an vollständig terminal sialylierten N-Glycanen des GA-EPOs, das während der exponentiellen Wachstumsphase produziert wurde, sind auch die qualitätsrelevanten Parameter am Ende der Kultivierung wichtig, um beurteilen zu können, wie robust die qualitätsrelevanten Parameter im Verlauf der Batchproduktion sind (*Chromatogramme nicht gezeigt*). Tabelle 3.6 auf Seite 82 gibt einen Überblick über die getesteten Medien, ihre Kultivierungseigenschaften und den Anteil an vollständig terminal sialylierten N-Glycanen während der exponentiellen Phase und am Ende der Kultivierung.

Der Prozentsatz an vollständig terminal sialylierten N-Glycanen des GA-EPOs, produziert mit den Medien DMEM F12 PDM 5.2 und CHO#6k (10%) / DMEM F12 PDM 5.2 (90%), fiel von der exponentiellen Phase bis zum Ende der Kultivierung jeweils nur um 5 bis 6 %, wohingegen der Prozentsatz bei der Kultivierung mit DMEM F12 PDM 3 und CHO#6k um 10 bzw. 11 % fiel, bei der Kultivierung mit Pro CHO 4 CDM (10%) / DMEM F12 PDM 5.2 (90%) sogar um 33 %. Da es sich hier um ein Mediumscreeing handelt, wurden keine tiefergehenden Versuche vorgenommen um diese Befunde zu untersuchen. Naheliegend ist jedoch, dass die Zellen durch Nährstofflimitierungen und/oder Akkumulation toxischer Metabolite wie Ammonium zum Ende der Kultivierung eine aberrente Biosynthese durchführen. Eine weitere Erklärung liefern die Arbeiten von Gramer, die zeigen konnten, dass durch Akkumulation von Sialidasen am Ende von Batch-Kultivierungen mit geringer Zellvitalität der Sialinsäuregehalt von rekombinanten Proteinen signifikant verringert ist (Gramer *et al.* 1995). Die Aktivität von Sialidasen ist zelllinienspezifisch, jedoch wurde auch in humanen Fibroblasten eine extrazelluläre Sialidaseaktivität festgestellt (Usuki *et al.* 1988).

Tabelle 3.6: Ergebnisse der getesteten Medien: Kultivierung als Wachstumskurve in Spinnerflaschen.

Medium	Max. erreichte vitale Zellzahl	Kulturzeit bei Erreichen der max. Zellzahl	Max. Produkt- konzentra- tion	¹ Kulturzeit bei Erreichen der Produkt- konzentration	vollständig terminal sialylierte Strukturen [%]	
	[Zellen/ml]	[h]	[µg/ml]	[h]	Exp. Phase	Ende der Kultur
DMEM F12 PDM 3	9,2 10 ⁵	116	24	137	53	43
CHO#6	1,1 10 ⁶	137	44	120	52	41
Pro CHO4 CDM (10%) / DMEM F12 PDM 5.2 (90%)	1,3 10 ⁶	98	41	168	52	19
DMEM F12 PDM 5.2	1,1 10 ⁶	76	24	96	45	40
CHO#6k (10%) / DMEM F12 PDM 5.2 (90%)	1,4 10 ⁶	67	40	93	55	49

¹hier: Erreichen der Größenordnung der max. Produktkonzentration

Die Einflüsse der Kultivierung auf die vollständige terminale Sialylierung der Glycane des produzierten GA-EPOs sind multifaktoriell. Durch die Ergebnisse der Analyse der Kultivierungsparameter können keine Rückschlüsse auf die Qualität des EPOs gezogen werden. Daher müssen die qualitätsrelevanten Parameter immer zusätzlich untersucht werden.

Die Kulturen zeigen mit den beiden Medien DMEM F12 PDM 3 und CHO#6k, bei denen die Lactatkonzentration nicht über 1,5 g / l steigt, einen hohen Anteil an vollständig terminal sialylierten N-Glycanen während der exponentiellen Wachstumsphase, der am Ende der Kultivierung nur im geringen Maße abgenommen hat. Dies ist jedoch ebenfalls bei der Kultur mit CHO#6k (10 %) / DMEM F12 PDM 5.2 (90 %) der Fall, bei der sich die Lactatkonzentration auf 2 g / l erhöht. Das bedeutet, dass die sich mit der Lactatkonzentration verschlechternden Wachstumseigenschaften nicht direkt mit der Qualität der Glycosylierung des EPOs verknüpft sind. Auch die Zellvitalität hat, wie oben diskutiert, alleine keinen ausschlaggebenden Einfluss auf den Anteil der

vollständig terminal sialylierten N-Glycane. Die Formulierungen der kommerziell erhältlichen Medien sind nicht bekannt. Ausführliche Versuche, bei denen bei einem Medium gezielt ein Parameter verändert wird, könnten Auskünfte über die Ursachen ermöglichen, waren jedoch nicht Ziel dieser Arbeit.

Das Medium **Pro CHO 4 CDM (10%) / DMEM F12 PDM 5.2 (90%)** wurde wegen der starken Verluste im Anteil der vollständig terminal sialylierten N-Glycane des damit produzierten EPOs im Verlauf der Kultivierung nicht weiter untersucht. Kulturen mit dem Medium **DMEM F12 PDM 5.2** wurden nicht weiter untersucht, da die Produktivität niedriger war als bei den anderen Medien. Ungünstig für einen Produktionsprozess wären zudem die bereits beschriebenen Unstabilitäten im Wachstum.

Das Produkt aus Kulturen mit der Mischung aus **CHO#6k (10%) / DMEM F12 PDM 5.2 (90%)** zeigte einen hohen Anteil an vollständig terminal sialylierten N-Glycanen, während der exponentiellen Wachstumsphase, der zum Ende der Kultivierung nur geringfügig abnahm. Ein Prozess mit diesem Medium lässt daher die größte Robustheit erwarten. Positiv waren außerdem schnelles Wachstum und die vergleichbar hohe maximale Produktkonzentration.

Die in **CHO#6k** kultivierten Zellen produzierten EPO mit einem hohen Prozentsatz an vollständig terminal sialylierten Strukturen, zudem konnte eine hohe maximale Produktkonzentration erreicht werden.

Diese beiden (*in der Tabelle gelb hinterlegten*) Medien wurden als Basalmedium in Betracht gezogen und im Folgenden weiter untersucht.

Die Kulturen mit **DMEM F12 PDM 3** wurden als Vergleich weiterhin untersucht.

3.2.5 Kultivierung im 2 l Bioreaktor

Für die endgültige Auswahl sollen die Medien mit Wachstumskurven im 2 l Bioreaktor unter kontrollierten Bedingungen getestet werden, da diese Bedingungen dem späteren Produktionsprozess entsprechen. Bei der Kultivierung sind das Wachstum, die Produktivität, die vollständige terminale Sialylierung und das *glycan pattern* der N-Glycane im Verlauf der Kultivierung sowie die Vergleichbarkeit der O-Glycane die entscheidenden Parameter, nach denen das Basalmedium ausgewählt werden soll. Hierzu wurden die

adaptierten Zellen nach der Revitalisierung in Doppelbestimmung in 2 l Bioreaktoren als Wachstumskurve kultiviert. Während der Kultivierung im Bioreaktor wurde der pH Wert bei 7,0 und der Sauerstoffpartialdruck auf 40 % Luftsättigung geregelt. Zur Inokulation der beiden Bioreaktoren wurden die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindenden Zellen aus dem Vorreaktor komplett abzentrifugiert und in frischem Medium aufgenommen. Zwei Liter Zellsuspension mit einer initialen Zellzahl von $2,5$ bis $3 \cdot 10^5$ Zellen / ml wurden kultiviert. Täglich wurden die Zellzahl (*vital und gesamt*), die Glucose-, Lactat-, Glutamin-, und Ammoniumionkonzentration, der pH Wert, die Produktkonzentration und die qualitätsrelevanten Parameter der N-Glycane mittels nativer HPAEC PAD ermittelt. Die Vergleichbarkeit der O-Glycane wurde mittels SDS PAGE / Western Blot beobachtet.

Abbildung 3.13 auf Seite 85 zeigt repräsentative Wachstumskurven der Kultivierungen mit DMEM F12 PDM 3, CHO#6k und DMEM F12 PDM 5.2 (90%) / CHO#6k (10%).

Die mit **DMEM F12 PDM 3** kultivierten Zellen wuchsen mit einer durchschnittlichen Wachstumsgeschwindigkeit von $0,016 \text{ h}^{-1}$ auf die maximale Lebendzellzahl von $1,66 \cdot 10^6$ Zellen / ml nach 114 h. Die gesamte Glucose wurde im Verlauf der Kultivierung verbraucht. Die Lactatkonzentration erreichte am Ende der Kultivierung 2 g / l . Die maximale Produktkonzentration lag bei 38 µg / ml . Bis zu diesem Zeitpunkt war die Vitalität durchgehend über 90 %. Im Vergleich zu der Kultivierung in Spinnerflaschen konnte eine höhere maximale Zellzahl, eine höhere durchschnittliche Wachstumsgeschwindigkeit sowie eine höhere Produktkonzentration nach einer kürzen Kultivierungszeit erreicht werden.

Zellen, die mit **CHO#6k** kultiviert wurden, wuchsen mit einer durchschnittlichen Wachstumsgeschwindigkeit von $0,01 \text{ h}^{-1}$ auf eine maximale vitale Zellzahl von $1,44 \cdot 10^6$ Zellen / ml nach 166 h. Die Lactatkonzentration am Ende der Kultivierung betrug 2 g / l . Es wurde eine maximale Produktkonzentration von 21 µg / ml erreicht. Die Vitalität betrug beim Abbruch der Kultivierung 78 %. Die durchschnittliche Wachstumsgeschwindigkeit im Bioreaktor war geringer als bei der Kultivierung in Spinnerflaschen. Dabei war die maximal erreichte Zellzahl im Bioreaktor etwas höher.

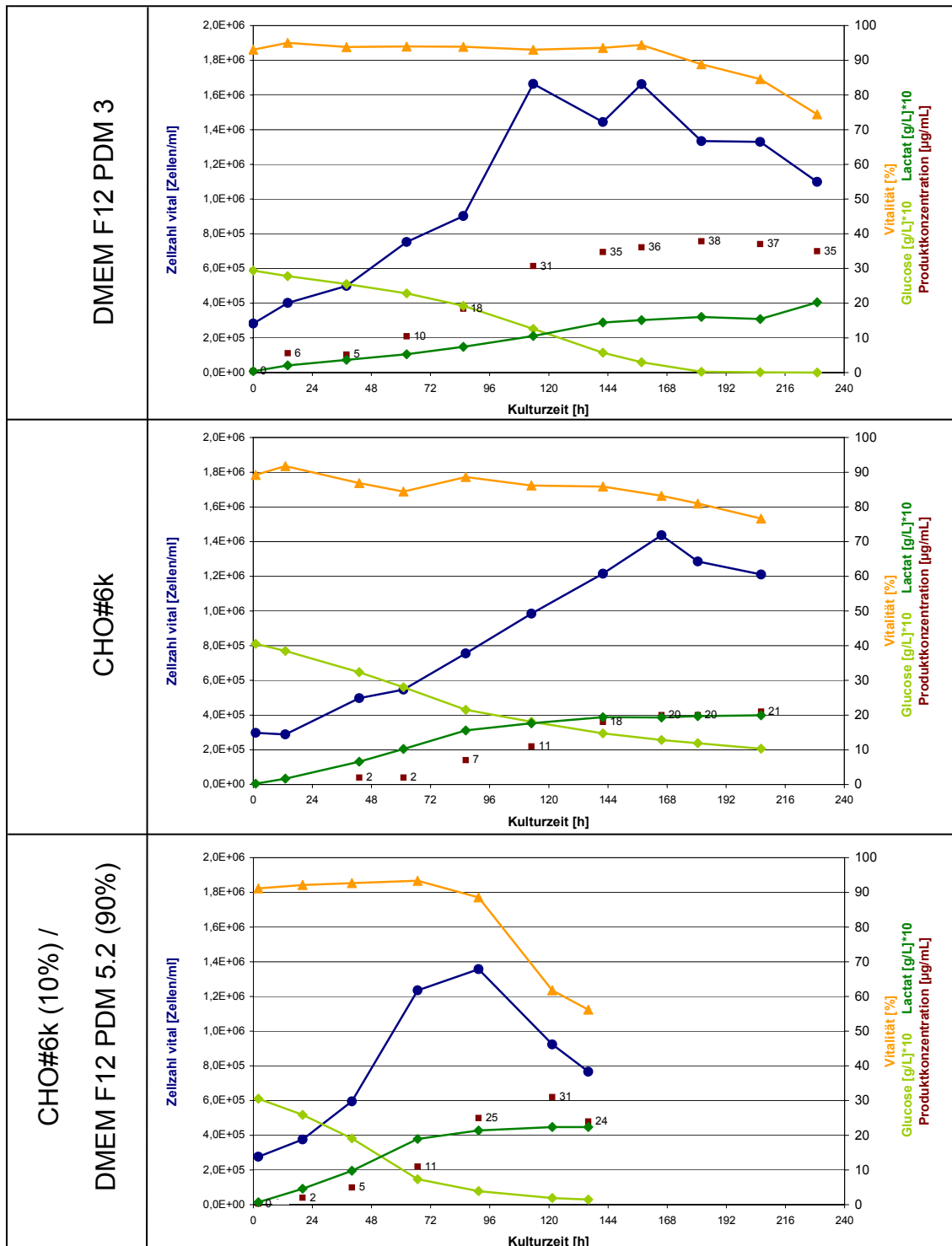


Abbildung 3.13: Wachstumseigenschaften von HT1080 GA-EPO Zellen kultiviert als Wachstumskurven in 2 l Bioreaktoren. Die Zellen wurden mit folgenden Medien kultiviert: DMEM F12 PDM 3, CHO#6k und CHO#6k (10%) / DMEM F12 PDM 5.2 (90%).

Die maximale Produktkonzentration im Bioreaktor erreichte nur den halben Wert der Spinnerflaschenkultur. Es wird vermutet, dass dies am erhöhten

Scherstress im Bioreaktor liegen könnte. Bei der Kultivierung mit dem ADF-haltigen Medium DMEM F12 PDM 3 schien dieser keine Auswirkungen zu zeigen; eventuell wirken die im Medium vorhandenen Proteine protektierend.

Die mit **DMEM F12 PDM 5.2 (90 %) / CHO#6k (10%)** kultivierten Zellen wuchsen mit einer durchschnittlichen Wachstumsgeschwindigkeit von $0,018 \text{ h}^{-1}$ innerhalb von 91 h auf eine Zellzahl von $1,4 \cdot 10^6$ Zellen / ml. Die Lactatkonzentration stieg bis zum Ende der Kultivierung auf 2,24 g / l. Es wurde eine maximale Produktkonzentration von 31 μg erreicht, allerdings betrug die Vitalität zu diesem Zeitpunkt nur noch 62 %. Die Wachstumsgeschwindigkeit im Bioreaktor war etwas niedriger als bei der Kultivierung in Spinnerflaschen, jedoch wurde die gleiche Zellzahl erreicht. Die maximal erreichte Produktkonzentration war im Bioreaktor etwas niedriger. Der Grund könnte wiederum der erhöhte Scherstress im Bioreaktor bei der Kultivierung mit dem ADF-freien Medium sein. Das rasche Absinken der Zellvitalität könnte eventuell ein Problem für den Produktionsprozess darstellen. Ein Grund dafür könnte eine Nährstofflimitierung sein. Um diese bei einem Perfusionsprozess auszugleichen, muss mit einer erhöhten Perfusionsrate produziert werden.

Die Zellen, die mit ADF-haltigem DMEM F12 PDM 3 kultiviert wurden, erreichten eine hohe Zellzahl und eine hohe Produktkonzentration (38 μg / ml) bei einer hohen Vitalität. Mit CHO#6k kultivierten Zellen wuchsen vergleichsweise langsam und erreichten ihre relativ niedrige maximale Produktkonzentration (21 μg / ml) nach ungefähr der gleichen Zeit wie die mit DMEM F12 PDM 3 kultivierten Zellen. Die Zellen, die mit DMEM F12 PDM 5.2 (90 %) / CHO#6k (10 %) kultiviert wurden, zeigten ein schnelles Wachstum und eine hohe Produktkonzentration (31 μg / ml nach 121 h). Hinsichtlich der Wachstumsgeschwindigkeit und des Produkttiters ist dieses ADF-freie Medium für den Produktionsprozess das geeignetste.

Zur Beurteilung der Produktqualität, die bei der Kultivierung mit den verschiedenen Medien erreicht wurde, wurden Analysen der **N-Glycane** durchgeführt. Dafür wurden ca. 200 μg GA-EPO aus den Zellkulturüberständen mittels Immunaffinitätschromatographie isoliert, die N-Glycane enzymatisch abgespalten und gereinigt. In den folgenden Abbildungen sind die HPAEC PAD

Chromatogramme der nativen N-Glycane des GA-EPOs, produziert mit den verschiedenen Medien, gezeigt. Es werden die N-Glycane des GA-EPOs analysiert und verglichen, die während der exponentiellen Phase, der stationären Phase und bis zum Ende der Kultivierung akkumulierten. In Abbildung 3.14 sind die Chromatogramme der N-Glycane von GA-EPO aus Kultivierungen mit dem ADF-haltigen Standardmedium **DMEM F12 PDM 3** zu verschiedenen Zeiten der Kultivierung zu sehen.

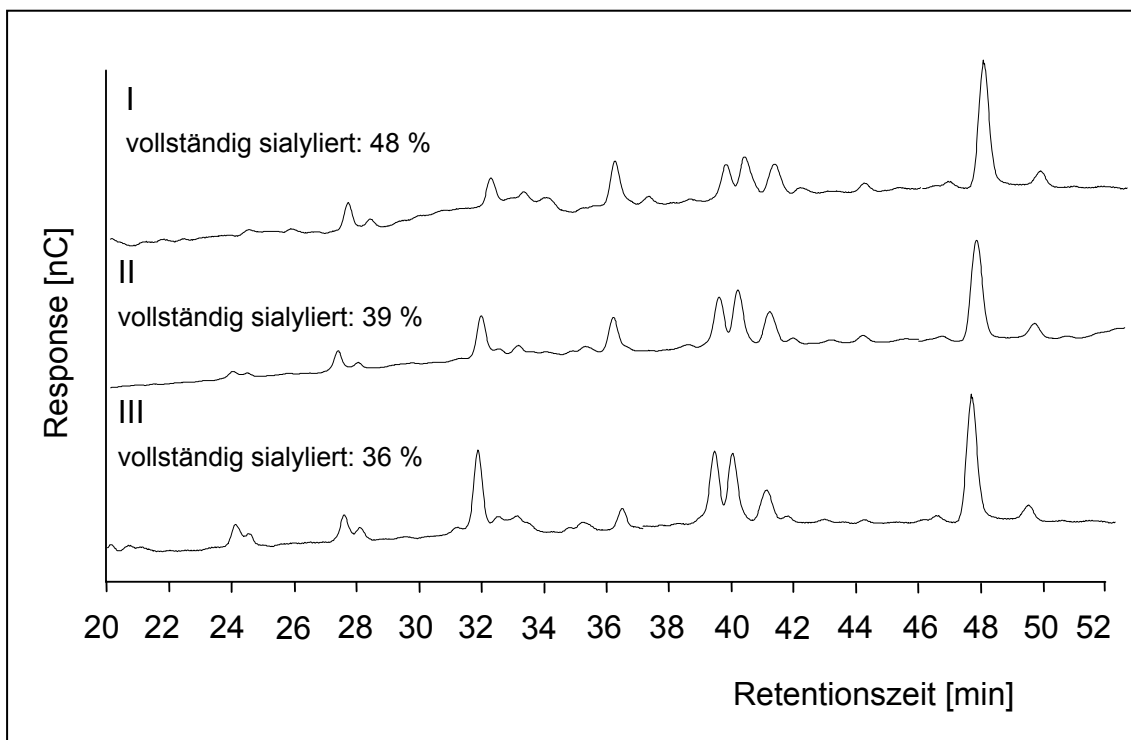


Abbildung 3.14: HPAEC PAD Analysen der nativen GA-EPO N-Glycane aus Zellkulturüberständen aus dem 2 l Bioreaktor mit DMEM F12 PDM 3. I: Probennahme in der Mitte der exponentiellen Phase (62 h), II: Probennahme bei hoher Produktkonzentration (114 h), III: Probennahme am Ende der Kultivierung (229 h). Die zugehörige Wachstumskurve ist Abbildung 3.13 dargestellt. Peak-Struktur Zuordnung: siehe Seiten 48 und 51

Der Anteil an vollständig terminal sialylierten N-Glycanen war mit 48 % schon in der Mitte der exponentiellen Phase (nach 62 h) relativ gering, bei Erreichen einer hohen Produktkonzentration (nach 114 h) war er auf 39 % gesunken. In der Probe am Ende der Kultivierung (nach 229 h) betrug er nur noch 36 %. Vitalität, Wachstumsgeschwindigkeit, Glucose- und Lactatkonzentration gaben während der Kultivierung keinen Hinweis auf die niedrige Sialylierung. Bei der Kultivierung in Spinnerflaschen lagen in dieser Phase der Kultivierung 53 %

vollständig terminal sialylierte Strukturen vor. Es könnte vermutet werden, dass sich die Kultivierung im Bioreaktor, genauer der erhöhte Scherstress, indirekt negativ auf die Sialylierung auswirkt, genauere Ursachen wurden jedoch nicht untersucht. Mit 39 % wird die Forderung von mindestens 40 % vollständig terminal sialylierter N-Glycane im *bulk harvest* nicht eingehalten. Dies liegt nicht an einem drastischen Absinken während der Kultivierung, sondern vielmehr an der schon geringen Sialylierung während der exponentiellen Phase. Würde eine Batchkultivierung mit diesem Medium betrieben, müsste nach dieser Forderung schon nach 62 h geerntet werden. Zu diesem Zeitpunkt lag die Produktkonzentration bei 10 µg / ml.

Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass bei der Kultivierung mit ADF-freiem Medium im Bioreaktor der Anteil an vollständig terminal sialylierten Strukturen hoch war.

Abbildung 3.15 zeigt die Chromatogramme der nativen N-Glycane nach der Analyse mit der HPAEC PAD von GA-EPO produziert mit **CHO#6k**.

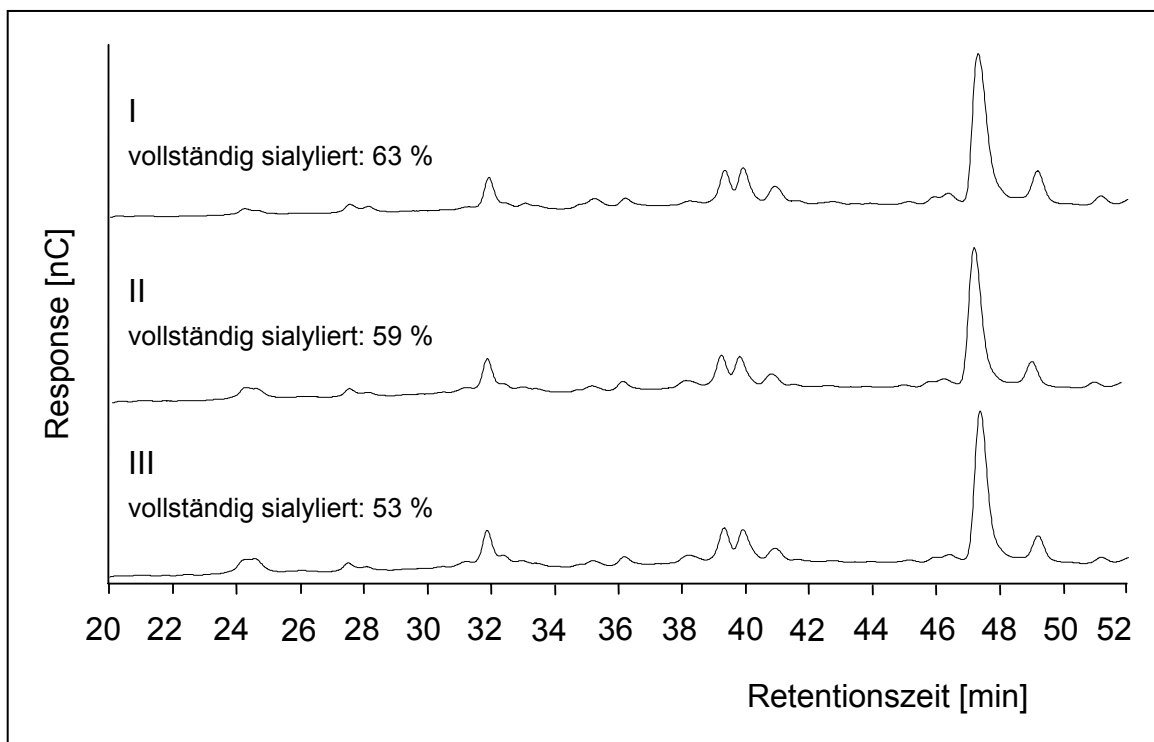


Abbildung 3.15: HPAEC PAD Analysen der nativen GA-EPO N-Glycane aus Zellkulturüberständen aus dem 2 I Bioreaktor mit CHO#6k. I: Probennahme in der Mitte der exponentiellen Phase (86 h), II: Probennahme am Ende der exponentiellen Phase (142 h), III: Probennahme am Ende der Kultivierung (206 h). Die dazugehörige Wachstumskurve ist in Abbildung 3.13 gezeigt. Peak-Struktur Zuordnung: siehe Seiten 48 und 51.

Der Anteil vollständig terminal sialylierter Strukturen in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase (nach 86 h) war mit 63 % sehr hoch. Auch bei Erreichen der Größenordnung der maximalen Produktkonzentration (142 h) ist der Anteil an vollständig terminal sialylierter N-Glycane bei 59 %, obwohl die Vitalität nur 86 % betrug und die Lactatkonzentration mit 1,94 g / l relativ hoch war. Der Prozentsatz an vollständig terminal sialylierten N-Glycanen am Ende der Kultivierung ist mit 53 % immer noch sehr hoch, obwohl sich das Produkt über 206 h akkumulierte und die Vitalität gegen Ende sogar unter 70 % sank. Bei einer Produktkonzentration von 20 µg / ml zum optimalen Erntezeitpunkt wäre die Ausbeute bei einer Kultivierung mit diesem Medium erheblich höher als bei einer Kultivierung mit DMEM F12 PDM 3. Hinzu käme eine erhöhte Ausbeute nach der Aufarbeitung, da dieses mit einem qualitativ hochwertigeren *bulk harvest* durchgeführt würde.

Abbildung 3.16 zeigt die HPAEC PAD Analysen der neutralen N-Glycane von GA-EPO kultiviert mit **CHO#6k (10 %) / DMEM F12 PDM 5.2 (90 %)**.

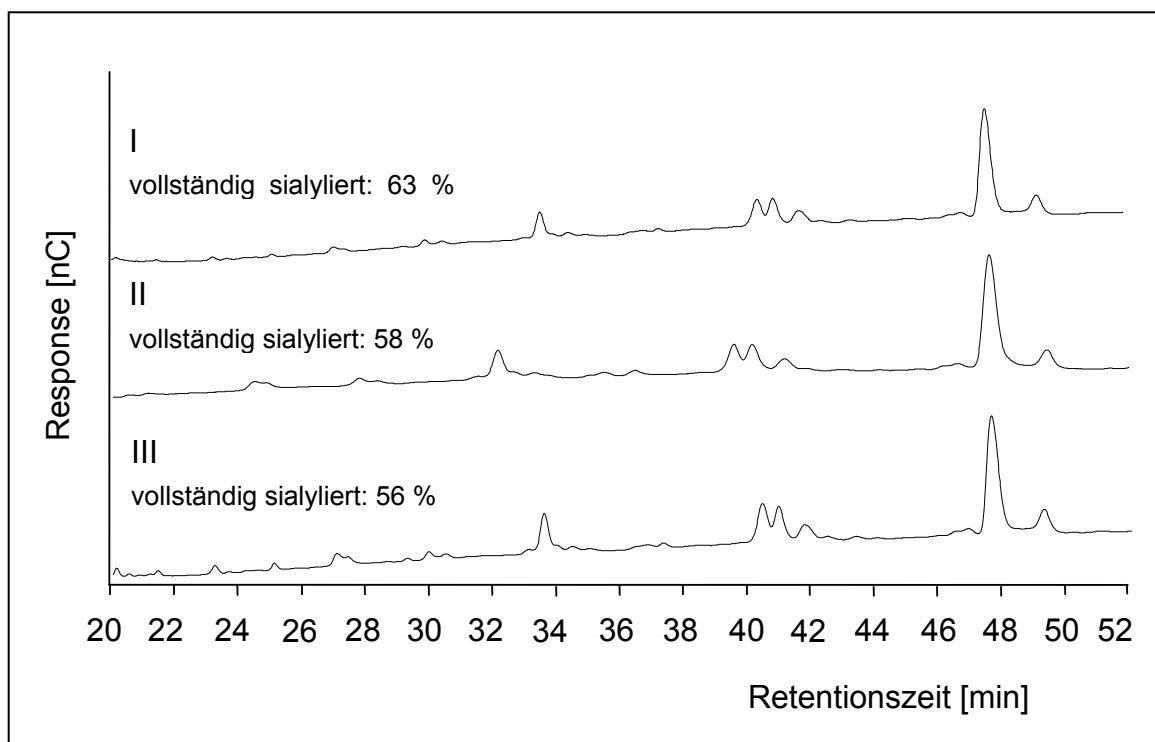


Abbildung 3.16: HPAEC PAD Analysen der nativen GA-EPO N-Glycane aus Zellkulturüberständen aus dem 2 l Bioreaktor mit CHO#6k (10%) / DMEM F12 PDM 5.2 (90%). I: Probennahme in der Mitte der exponentiellen Phase (67 h), II: Probennahme am Ende der exponentiellen Phase (91 h), III: Probennahme am Ende der Kultivierung (136 h).

Die Unterschiede in den Retentionszeiten der Peaks der verschiedenen Proben liegen an der Durchführung der Analysen mit unterschiedlich belasteten Chromatographiesäulen. Peak-Struktur Zuordnung: siehe Seiten 48 und 51.

Der Anteil der vollständig terminal sialylierten N-Glycane war in der Mitte der exponentiellen Phase (nach 67 h) mit 63 % sehr hoch. Auch am Ende der exponentiellen Phase, bei einer Produktkonzentration von 25 µg / ml (nach 91 h), konnte mit 58 % ein sehr hoher Anteil an vollständiger terminaler Sialylierung ermittelt werden, obwohl die Lactatkonzentration auf 2,14 g / l gestiegen und die Glucosekonzentration auf 0,39 g / l gefallen war. Nach 136 h, am Ende der Kultivierung, war die Vitalität rapide auf 56 % gefallen. Trotzdem wurden 56 % vollständig terminal sialylierte Strukturen detektiert. Es kann also davon ausgegangen werden, dass nach 120 h Kultivierung und 31 µg / ml GA-EPO ein Prozentsatz an vollständig terminal sialylierten N-Glycanen zwischen 58 und 56 % vorliegt und dies somit der geeignete Erntezeitpunkt bei einer Batchkultivierung wäre. In der Folge wäre die Ausbeute bei einer Kultivierung mit diesem Medium am höchsten.

Trotz niedriger Energiesubstratkonzentration und geringer Zellvitalität war der Anteil der vollständig terminal sialylierten N-Glycane bei der Kultivierung mit diesem Medium sehr hoch. Insgesamt weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die geeigneten zellphysiologischen Parameter wichtig für die Sialylierung sind.

Zur Überprüfung der Vergleichbarkeit mit dem GA-EPO aus dem Airlift-Prozess wurden die **O-Glycanstrukturen** des GA-EPOs, das mit den verschiedenen Medien produziert wurde, mittels SDS Gelelektrophorese / Western Blot untersucht.

Abbildung 3.17 zeigt die SDS PAGE / Western Blot Analyse von GA-EPO, nativ und de-N-glycosyliert, produziert von Zellen, die mit dem ADF-haltigen Standardmedium **DMEM F12 PDM 3** im 2 l Bioreaktor kultiviert wurden. Aufgetragen wurden Proben von drei verschiedenen Kultivierungsphasen.

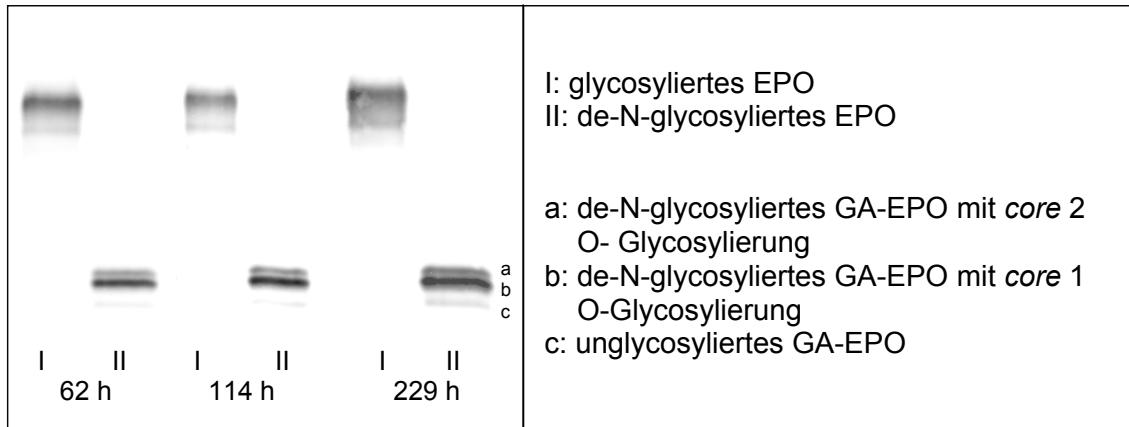


Abbildung 3.17: SDS PAGE / Western Blot Analyse der O-Glycosylierung von GA-EPO produziert im Verlauf der Kultivierung im 2 l Bioreaktor mit DMEM F12 PDM 3. (Der dazugehörige Verlauf der Wachstumskurve und die qualitätsrelevanten Parameter sind in den Abbildungen 3.13 und 3.14 dargestellt.) Nach 62 h befinden sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase, nach 114 h ist eine hohe Produktkonzentration erreicht und nach 229 h wurde die Kultivierung beendet. In den Spuren „I“ ist jeweils das glycosylierte EPO, in den Spuren „II“ das de-N-glycosylierte EPO zu sehen. Pro Spur wurden 50 ng Protein aufgetragen.

Auf dem Western Blot sind keine Unterschiede in der Mikroheterogenität der O-Glycosylierung im Verlauf der Kultivierung erkennbar. Ca. 30 % des untersuchten Proteins zeigte eine core 2 O-Glycanstruktur, bei ca. 60 % wurde eine core 1 O-Glycanstruktur und bei ca. 10 % keine O-Glycanstruktur festgestellt. Der hohe Prozentsatz der core 2 Strukturen entspricht dem des GA-EPOs produziert mit SMIF 7, weicht jedoch deutlich von den ca. 3 % ab, die beim GA-EPO aus dem Airlift-Prozess detektiert wurden. Die Vergleichbarkeit ist demnach, wie schon zuvor in Kapitel 3.1.2.2 diskutiert wurde, nicht gegeben.

Die Ergebnisse der gelelektrophoretischen Untersuchungen der ADF-freien Medien werden in den folgenden Abbildungen dargestellt. Abbildung 3.18 zeigt die SDS PAGE / Western Blot Analyse von GA-EPO, nativ und de-N-glycosyliert, produziert von Zellen, die mit **CHO#6k** kultiviert wurden. Aufgetragen wurden Proben von drei verschiedenen Kultivierungsphasen.

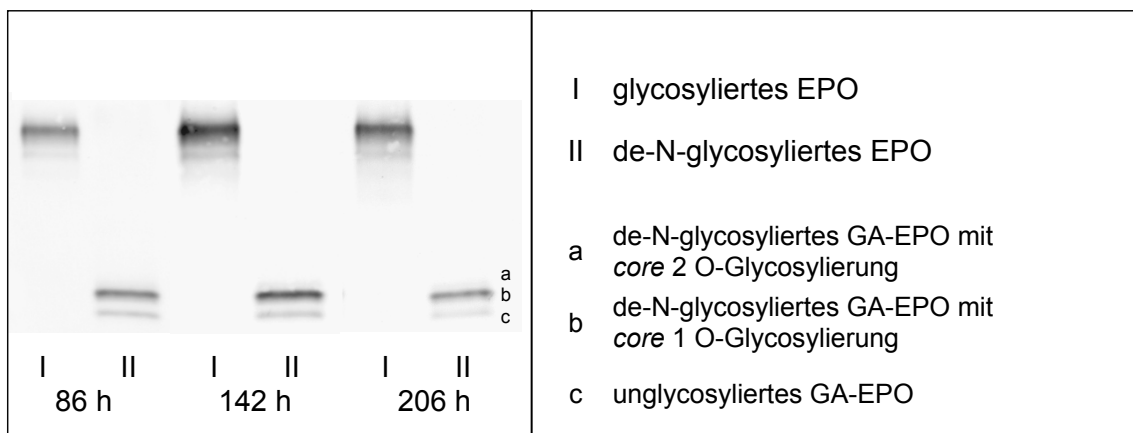


Abbildung 3.18: SDS PAGE / Western Blot Analyse der O-Glycosylierung von GA-EPO produziert im Verlauf der Kultivierung im 2 l Bioreaktor mit CHO#6k. (Der dazugehörige Verlauf der Wachstumskurve und die qualitätsrelevanten Parameter sind in den Abbildungen 3.13 und 3.15 dargestellt.) Nach 86 h befinden sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase, nach 142 h ist eine hohe Produktkonzentration erreicht und nach 206 h wurde die Kultivierung beendet. In den Spuren „I“ ist jeweils das glycosylierte EPO, in den Spuren „II“ das de-N-glycosylierte EPO zu sehen. Pro Spur wurden 50 ng Protein aufgetragen.

Die Mikroheterogenität der O-Glycanstrukturen änderte sich im Verlauf der Kultivierung nicht. Weniger als 10 % des aufgetragenen Proteins wiesen eine core 2 O-Glycanstruktur auf, ca. 85 % zeigten eine core 1 O-Glycosylierung und ca. 10 % waren nicht O-glycosyliert. Diese Heterogenität der verschiedenen O-Glycanstrukturen ist demnach vergleichbar mit der der O-Glycane des GA-EPOs aus dem Airlift-Prozess.

Abbildung 3.19 zeigt die SDS PAGE / Western Blot Analyse von GA-EPO, nativ und de-N-glycosyliert, produziert von Zellen, die mit dem ADF-freien **DMEM F12 PDM 5.2 (90 %) / CHO#6k (10 %)** im 2 l Bioreaktor kultiviert wurden, im Verlauf der Kultivierung.

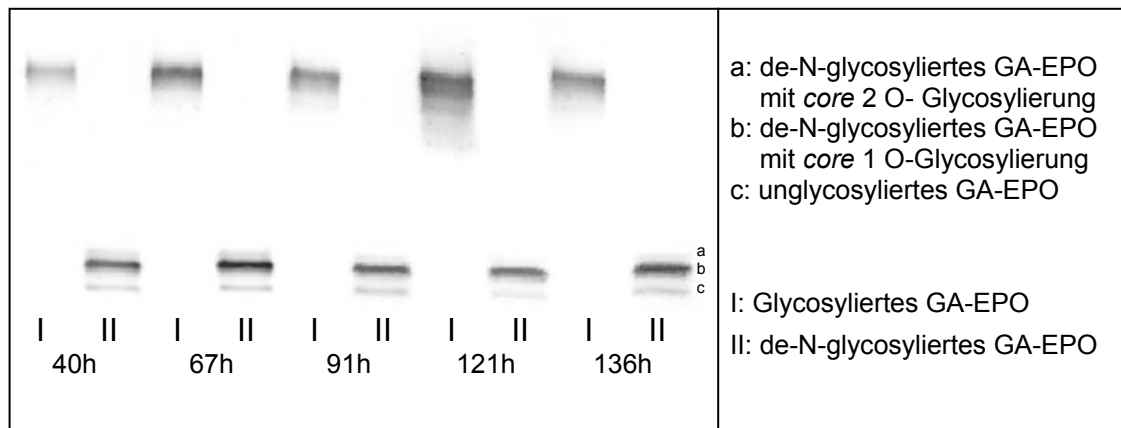


Abbildung 3.19: SDS PAGE / Western Blot Analyse der O-Glycosylierung von GA-EPO produziert im Verlauf der Kultivierung im 2 l Bioreaktor mit CHO#6k (10 %) / DMEM F 12 PDM 5.2 (90 %). (Der dazugehörige Verlauf der Wachstumskurve und der qualitätsrelevanten Parameter sind in den Abbildungen 3.13 und 3.15 dargestellt.) Versehentlich wurde in der Spur des glycosylierten GA-EPOs nach 121 h 100 ng Protein aufgetragen, die anderen Spuren wurden mit jeweils 50 ng Protein beladen.

Es konnte keine Veränderung der Mikroheterogenität der O-Glycosylierung mit der Western Blot Analyse im Verlauf der Kultivierung festgestellt werden. Wie aus Abbildung 3.19 hervorgeht, war weniger als 10 % des aufgetragenen Proteins core 2 O-glycosyliert, ca. 85 % des Proteins zeigte eine core 1 O-Glycosylierung und ca. 10 % waren nicht O-glycosyliert. Die quantitative Verteilung der verschiedenen O-Glycanstrukturen entspricht der des GA-EPOs aus dem Airlift-Prozess.

Die Kultivierungen im Bioreaktor ergeben bei allen drei Medien bezüglich der O-Glycosylierungsvarianten keine Unterschiede zur Kultivierung in Spinnerflaschen. Die O-Glycosylierung wurde also nicht von der Kultivierung im geregelten Bioreaktor beeinflusst. Bezüglich der Mikroheterogenität der O-Glycosylierung sind die Produkte der HT1080 GA-EPO Zellen kultiviert mit den beiden ADF-freien Medien CHO#6k und CHO#6k (10 %) / DMEM F 12 PDM 5.2 (90 %) im Bioreaktor vergleichbar mit dem Produkt aus dem Airlift-Prozess.

Nach Überprüfung der Wachstumsgeschwindigkeit und der Produktivität der Zellen, der qualitätsrelevanten Parameter des Produkts und der Vergleichbarkeit des produzierten Produktes mit dem Produkt aus der Airlift-

Kultivierung erwies sich das ADF-freie Medium CHO#6k (10 %) / DMEM F12 PDM 5.2 als das geeignetste der getesteten Medien und wird somit als Basalmedium für die Entwicklung des Produktionsprozesses ausgewählt.

3.2.6 Langzeitstabilität

Um einen robusten Produktionsprozess zu gewährleisten, ist es wichtig, dass die Zellen über den geplanten Produktionszeitraum und einem zusätzlichen Sicherheitsintervall stabil hinsichtlich des Zellwachstums, der Produktivität und der Produktqualität aufweisen sind. Daher wird als Teil der Charakterisierung der Zelllinie die Langzeitkultivierung von Zellen über den geplanten Produktionszeitraum hinaus gefordert (Memorandum „*Points to consider in the Characterization of Cell Lines Used to Produce Biologicals*“ (1993) der FDA).

Um die phänotypische Stabilität der Zellen in den Medien DMEM F12 PDM 3, CHO#6k und CHO#6k (10 %) / DMEM F 12 PDM 5.2 (90 %) zu zeigen, wurden die Zellen über 5 Monate in Spinnerflaschen subkultiviert und das Wachstumsverhalten, die Produktivität, die qualitätsrelevanten Parameter sowie die Vergleichbarkeit des Produkts zum Produkt aus der Airlift-Kultivierung verifiziert. Dabei wurden sie dreimal wöchentlich passagiert. Die Anfangszellzahl nach jeder Passage betrug $3 \cdot 10^5$ Zellen / ml und die Lactatkonzentration wurde durch Mediumaustausch bei jeder Passagierung auf unter 0,7 g / l eingestellt. Vor der Passagierung wurde die Zellzahl (*gesamt und vital*), die Glucose-, Lactat-, Glutamin- und Ammoniumionenkonzentrationen gemessen. Die Produktkonzentration eines jeden Batches wurde bestimmt und die vollständige terminale Sialylierung sowie das *glycan pattern* der N-Glycane des GA-EPOs wurden zweimal im Monat analysiert. Die Vergleichbarkeit der O-Glycanstrukturen wurde ebenfalls zweimal im Monat untersucht.

Während der Kultivierung über 5 Monate mit den Medien DMEM F12 PDM 3, CHO#6k und CHO#6k (10 %) / DMEM F12 PDM 5.2 (90%) waren die Wachstumsgeschwindigkeiten in allen Medien konstant. Vitalitäten unter 90 % wurden nur in Einzelfällen gemessen; es wurden keine Tendenzen wie z. B. die Abnahme der Vitalität mit zunehmendem Alter der Kultur festgestellt. Die Glucose- und Glutaminverbrauchsraten sowie die Lactat- und Ammoniumionbildungsraten zeigten nur geringfügige Abweichungen

untereinander. Die Produktkonzentrationen von durchschnittlich 15,7 µg / ml (CHO#6k), 14,8 µg / ml (DMEM F12 PDM 3) und 14,5 µg / ml (CHO#6k (10 %) / DMEM F12 PDM 5.2 (90%)) zeigten Abweichungen von Passage zu Passage von max. \pm 5 µg, jedoch keinen Trend über den Kultivierungszeitraum.

Für die Glycananalysen mittels HPAEC PAD wurden jeweils Proben von ca. 200 µg GA-EPO aus den Zellkulturüberständen mittels Immunaффinitätschromatographie aufgereinigt. Die N-Glycane wurden enzymatisch abgespalten, gereinigt und für die HPAEC PAD Analyse eingesetzt.

Abbildung 3.20 auf Seite 96 zeigt die HPAEC PAD Analysen der nativen N-Glycane von GA-EPO produziert mit ADF-freiem **DMEM F12 PDM 5.2 (90 %) / CHO#6k (10 %)** zu drei verschiedenen Zeitpunkten während der Langzeitkultivierung.

Während der Kultivierung der Zellen mit CHO#6k (10 %) / DMEM F12 PDM 5.2 (90 %) war die vollständige terminale Sialylierung über den gesamten getesteten Zeitraum von 5 Monaten über der Spezifikation von mindestens 40 % und konstant. Es wurden keine qualitativ neuen N-Glycanstrukturen festgestellt.

Auch die *N-glycan pattern* des GA-EPOs, das während der Langzeitkultivierung mit den Medien DMEM F12 PDM 3 und CHO#6k produziert wurde, zeigten über den getesteten Zeitraum keine Veränderungen und der Anteil der vollständig terminal sialylierten Strukturen lag über der Spezifikation von 40 % und blieb konstant. (*Daten nicht gezeigt.*)

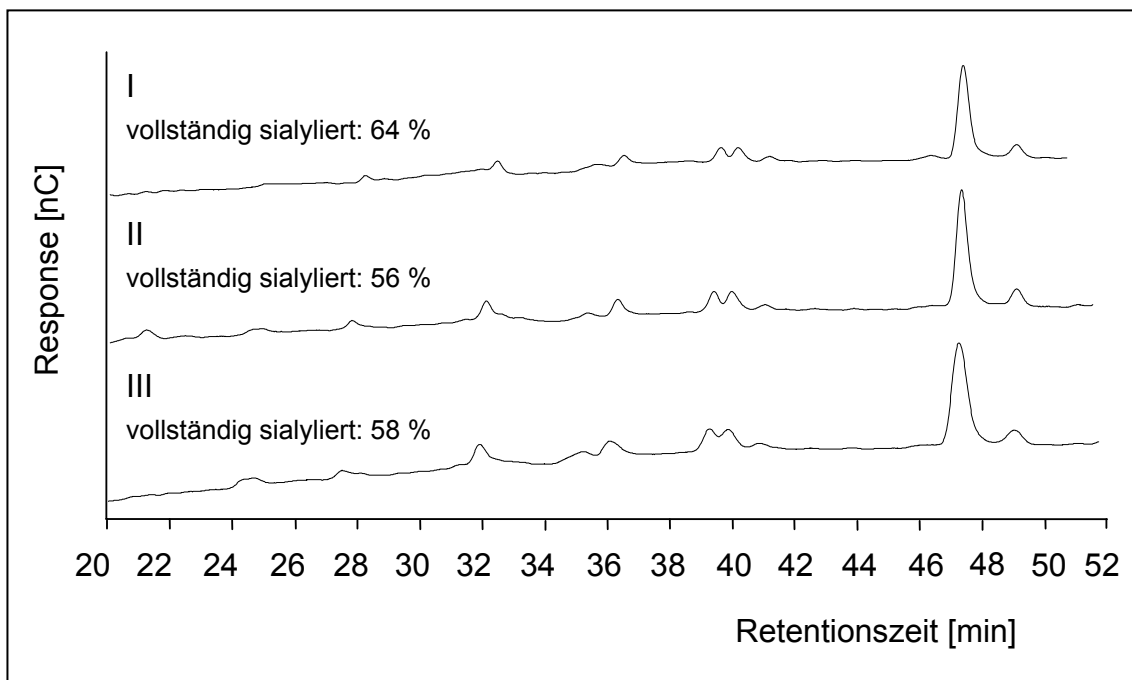


Abbildung 3.20: HPAEC PAD Analysen der nativen GA-EPO N-Glycane aus Zellkulturüberständen aus Langzeitkultivierungen von HT1080 GA-EPO Zellen kultiviert mit CHO#6k (10 %) / DMEM F12 PDM 5.2 (90 %) in Spinnerflaschen. I: Probenahme nach 54 Tagen, II: Probenahme nach 103 Tagen III: Probenahme nach 138 Tagen. Peak-Struktur Zuordnung: siehe Seiten 48 und 51.

Die O-Glycane wurden einmal monatlich mittels SDS PAGE / Western Blot auf ihre Vergleichbarkeit zu denen des GA-EPOs aus dem Airlift-Prozess untersucht. Dabei wurden beim GA-EPO, das mit den Medien CHO#6k und CHO#6k (10 %) / DMEM F12 PDM 5.2 (90 %) produziert wurde, jeweils bei weniger als 10 % des untersuchten Proteins eine *core 2* O-Glycanstruktur, bei ca. 85 % eine *core 1* O-Glycanstruktur und bei ca. 10 % keine O-Glycanstruktur festgestellt (*Daten nicht gezeigt*). Von den O-Glycanen, die mit DMEM F12 PDM 3 produziert wurden, zeigten ca. 30 % eine *core 2* Struktur, ca. 60 % eine *core 1* Struktur und ca. 10 % keine O-Glycosylierung. Im Verlauf der Kultivierungen wurden keine Veränderungen in der Mikroheterogenität der O-Glycosylierung festgestellt. Somit ist das GA-EPO, dass mit den Medien CHO#6k und CHO#6k (10 %) / DMEM F12 PDM 5.2 (90 %) produziert wurde, auch über diesen langen Kultivierungszeitraum bezüglich der O-Glycosylierung vergleichbar mit dem Produkt aus der Airlift-Kultivierung.

Bei den Langzeitkultivierungen über 5 Monate ergaben sich bei keinem der getesteten Medien Änderungen bezüglich der Kultivierungseigenschaften, der

Produktivität, dem Prozentsatz der vollständigen terminalen Sialylierung und des *glycan patterns* der N-Glycane oder der Vergleichbarkeit mit dem GA-EPO aus dem Airlift-Prozess. Bezüglich der Langzeitkultivierung ist das gewählte Basalmedium CHO#6k (10 %) / DMEM F12 PDM 5.2 (90 %) als Produktionsmedium geeignet.

Zusammenfassung:

Medienentwicklung und –*screening* führten zu zwei für den Produktionsprozess geeigneten ADF-freien Medien, CHO#6k und CHO#6k (10 %) / DMEM F12 PDM 5.2 (90 %). In beiden Medien kultivierte Zellen zeigten eine hohe Produktivität, ihre Produkte erfüllten die Spezifikation von mindestens 40 % vollständig terminal sialylierten N-Glycanen und waren hinsichtlich des *N-glycan patterns* und der Mikroheterogenität der O-Glycosylierung vergleichbar mit dem Produkt aus der Airlift-Kultivierung. Die phänotypische klonale Stabilität ist bei den Zellen aus beiden Kultivierungen gegeben. Da die Zellen bei der Kultivierung mit dem Medium CHO#6k (10 %) / DMEM F12 PDM 5.2 (90 %) eine höhere Produktivität und eine höhere Wachstumsgeschwindigkeit aufweisen und das Medium DMEM F12 PDM 5.2 sehr viel kostengünstiger ist als das Medium CHO#6k, wurde die Mediummischung als Basismedium für die Prozessentwicklung ausgewählt.

3.3 Entwicklung eines robusten Produktionsprozesses

Ausgehend von den bisher erhaltenen Daten soll die Entwicklung des Produktionsprozesses für die Produktion von GA-EPO mit HT1080 GA-EPO Zellen mit dem etablierten Medium CHO#6k (10%) / DMEM F12 PDM 5.2 (90 %) durchgeführt werden. Zum Verständnis des Prozesses, das in der PAT-Anleitung gefordert wird, sollen die schon identifizierten qualitätsrelevanten Parameter in den Prozess implementiert werden. Es soll ein *bulk harvest* produziert werden, das einen Anteil von mindestens 40 % vollständig terminal sialylierter N-Glycane aufweist. Dadurch ist eine Aufarbeitung mit einer hohen

Produktausbeute möglich, da die niedrig sialylierten Fraktionen während der Aufarbeitung verworfen werden müssen. Zudem soll das Produkt aus dem Produktionsprozess vergleichbar zu dem aus dem Airlift-Prozess sein.

Im Folgenden werden die drei Kultivierungsstrategien für GA-EPO, Batch, *repeated* Batch und Perfusionskultivierung aufgezeigt. Für die technisch anspruchsvolle Perfusionskultivierung werden außerdem Entwicklung zu einem robusten Prozess dargestellt.

3.3.1 Produktion von GA-EPO mit einem Batch Prozess

Die Kultivierung im Batchmodus ist aufgrund der sehr einfachen Technologie der am häufigsten angewendete Produktionsprozess. Der hier vorgestellte Prozess wurde zweimal reproduziert. Für die Herstellung von GA-EPO wurden die cryokonservierten HT1080 GA-EPO Zellen aus der *working cell bank* nach dem Auftauen über Nacht in einer T-Flasche und dann in Spinnerflasche kultiviert, und anschließend in einen 2 l Bioreaktor überimpft. Aus diesem wurden die Zellen in den 2 l Produktionsreaktor überführt. Im Gegensatz zu der Kultivierung als Wachstumskurve werden die Zellen vor der Kultivierung im Batchprozess nicht komplett abzentrifugiert und in frischem Medium aufgenommen, sondern mit 20 % konditioniertem Medium inokuliert. Dieses Vorgehen entspricht einem Produktionsprozess, bei dem während der Anzuchtphase von kleineren zu größeren Bioreaktoren das Medium ebenfalls nicht abzentrifugiert wird.

Als Anfangszellzahl wurden 2,5 bis $3 \cdot 10^5$ Zellen / ml gewählt. Auch für die im Folgenden beschriebenen Prozesse wurde dieses Verfahren gewählt, so dass sie unter gleichen Ausgangsbedingungen durchgeführt wurden. Bei allen Prozessen wurden die Parameter Zellzahl (*gesamt und vital*), Glucose-, Lactat-, Glutamin- und Ammoniumionenkonzentration gemessen. Die qualitätsrelevanten Parameter wurden analysiert. Abbildung 3.21 zeigt einige der Kultivierungsdaten des Batchprozesses

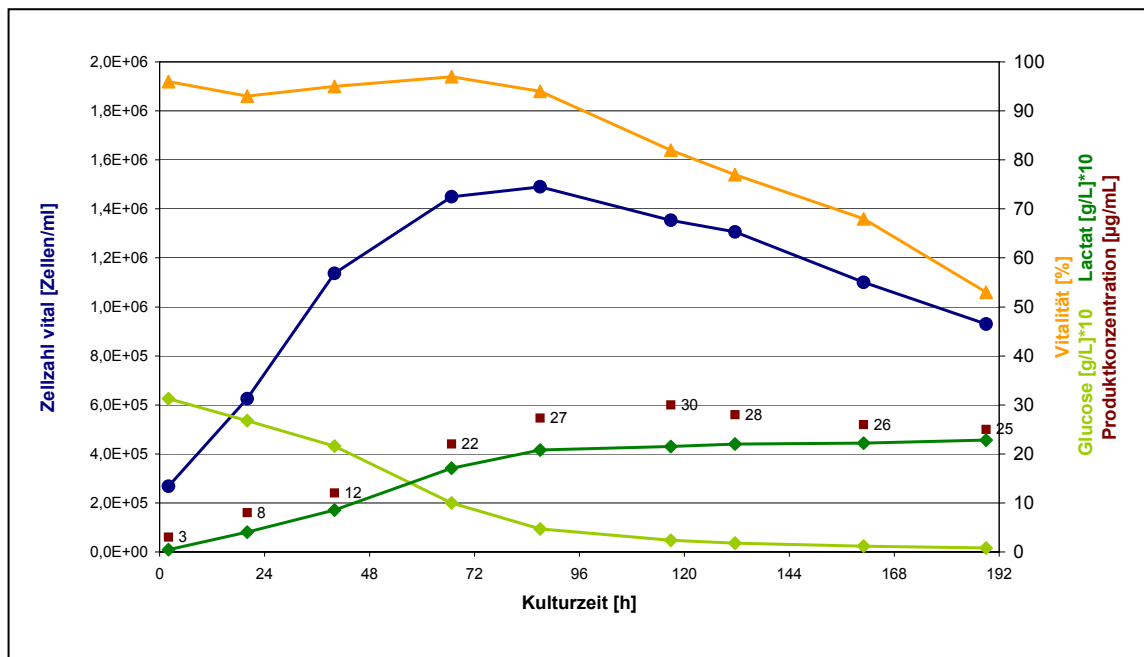


Abbildung 3.21: Kultivierung der HT1080 GA-EPO Zellen im Batchmodus. Darstellung von Zellzahl, Vitalität, Glucose-, Lactat- und Produktkonzentration während der Kultivierung.

Die Zellen wuchsen mit einer durchschnittlichen Wachstumsgeschwindigkeit von $0,020 \text{ h}^{-1}$ innerhalb von 87 h auf eine Zellzahl von $1,49 \cdot 10^6$ Zellen / ml. Es wurde eine maximale Produktkonzentration von 30 µg erreicht. Der Anteil an vollständig terminal sialylierten N-Glycanen lag nach 87 h bei 56 %, nach 120 h bei 53 % (*Daten nicht gezeigt*). Daher wäre der geeignete Erntezeitpunkt zwischen diesen beiden Probenahmen.

Bei anderen Produktionsprozessen wird sowohl in nicht geregelten Systemen, wie z. B. Rollerflaschen, als auch in Bioreaktoren kultiviert. Für die Kultivierung im Batch-Modus, insbesondere in Rollerflaschen, spricht die sehr einfache Technologie; die Möglichkeit eines *Up Scales* mittels Erhöhung der Anzahl der verwendeten Rollerflaschen durch Automatisierung vorzunehmen, ohne den biologischen Prozess verändern zu müssen sowie die geringen Produktverluste im Falle einer Kontamination einzelner Flaschen (Tsao *et al.* 1992). Andererseits fehlen die Regelungen für die Konzentration des gelösten Sauerstoffs und den pH Wert. Daher wurde für die Batchkultivierung hier ein geregelter Bioreaktor gewählt.

Bei allen Batchprozessen ändern sich die Kultivierungsbedingungen für die Zellen im Laufe der Produktion. Auch die posttranslationale Modifikationen, wie

z. B. die Mikroheterogenität der Glycosylierung, sind von diesen Veränderungen betroffen. Die Mikroheterogenität der Glycane kann zunehmen und die Spezifikationen für die einzelnen Batches müssten breit angelegt werden. Ein allgemeines Problem bei Batchprozessen, bei der Verwendung von Rollerflaschen wie auch bei geregelten Kultivierungen im Bioreaktor, ist die Akkumulation toxischer Metabolite wie z. B. Ammonium und Lactat, die sich negativ auf Zellenwachstum und -vitalität und somit auf die Produktqualität auswirken können. Durch den Einfluss von sich ebenfalls akkumulierenden Proteasen, Glycosidasen, insbesondere Sialidasen wird ein glycosyliertes Produkt mit zunehmender Länge des Produktionsprozesses immer stärker geschädigt (Gramer *et al.* 1995). Zudem ist das sich akkumulierende Wirtszellprotein eine Belastung während der Aufarbeitung. Dadurch entsteht die Notwendigkeit, den Erntezeitpunkt so zu optimieren, dass die Produktkonzentration hoch und die Produktdegradation niedrig ist. Dies kann zu niedrigen Gesamtausbeuten führen.

Mit dem für die HT1080 GA-EPO Zelllinie hier entwickelten Medium CHO#6k (10%) / DMEM F12 PDM 5.2 (90 %) nimmt der Anteil an vollständig terminal sialylierten N-Glycanen im Verlauf der Batchkultivierung nur geringfügig ab; daher kann der Zeitpunkt der Ernte der Zeitpunkt der höchsten Proteinkonzentration sein. Die herkömmlichen Probleme der Batchprozesse zeigten hier keinen Einfluss auf die qualitätsrelevanten Parameter, daher wäre die Kultivierung im Batchmodus eine denkbare Produktionsstrategie für GA-EPO. Allerdings wäre die Ausbeute von 27 bis 30 µg / ml in 3,5 bis 5 Produktionstagen relativ gering. Um die Ausbeuten des Batch-Prozesses noch zu verbessern, müssten u.a. die Energiequellen und die Aminosäuren des Mediums aufgestockt werden, so dass das Absterben der Zellen aufgrund von Nährstofflimitierungen, das schon nach 96 h Kultivierung beginnt, hinausgezögert wird und sich mehr Produkt akkumulieren kann. Oft wird diese Form der Mediumaufstockung auch als Fed-Batch Kultivierung realisiert.

3.3.2 Produktion von GA-EPO mit einem *repeated* Batch Prozess

Die relativ niedrige Ausbeute eines Batchprozesses kann durch die Anwendung eines *repeated* Batch Verfahrens unter Beibehaltung der einfachen Technologie

erhöht werden. Die Versuche zur Langzeitkultivierung stellen eine *repeated* Batch Kultivierung im Spinner da. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen mit dem ausgewählten Medium über mehr als 5 Monate stabil sind und mit gleichbleibenden qualitätsrelevanten Parametern produzieren werden können. Für die Herstellung von GA-EPO mit einem *repeated* Batch Prozess wurden cryokonservierte HT1080 GA-EPO Zellen aus der *working cell bank* nach dem Auftauen über Nacht in einer T-Flasche und dann in Spinnerflaschen kultiviert, bis die Zellzahl ausreichend für die Inokulation eines 2 l Bioreaktors ausreichte. Aus diesem wurden die Zellen in den 2 l Produktionsreaktor überführt. Im Gegensatz zu der Kultivierung als Wachstumskurve werden die Zellen vor der Kultivierung im Batchprozess nicht komplett abzentrifugiert und in frischem Medium aufgenommen, sondern mit $20 \pm 5 \%$ konditioniertem Medium inokuliert. Die Ausgangszellzahl liegt bei $2,5$ bis $3 \cdot 10^5$ Zellen / ml. Die Erfahrung aus *repeated* Batch Kultivierungen in Spinnerflaschen zeigt, dass vor dem Ende der exponentiellen Wachstumsphase geerntet werden muss, damit die Zellen nach einem Einzelbatch mit gleicher Wachstumsgeschwindigkeit weiterwachsen. Abbildung 3.22 zeigt eine der drei durchgeführten Kultivierungen mit einer *repeated* Batch Strategie.

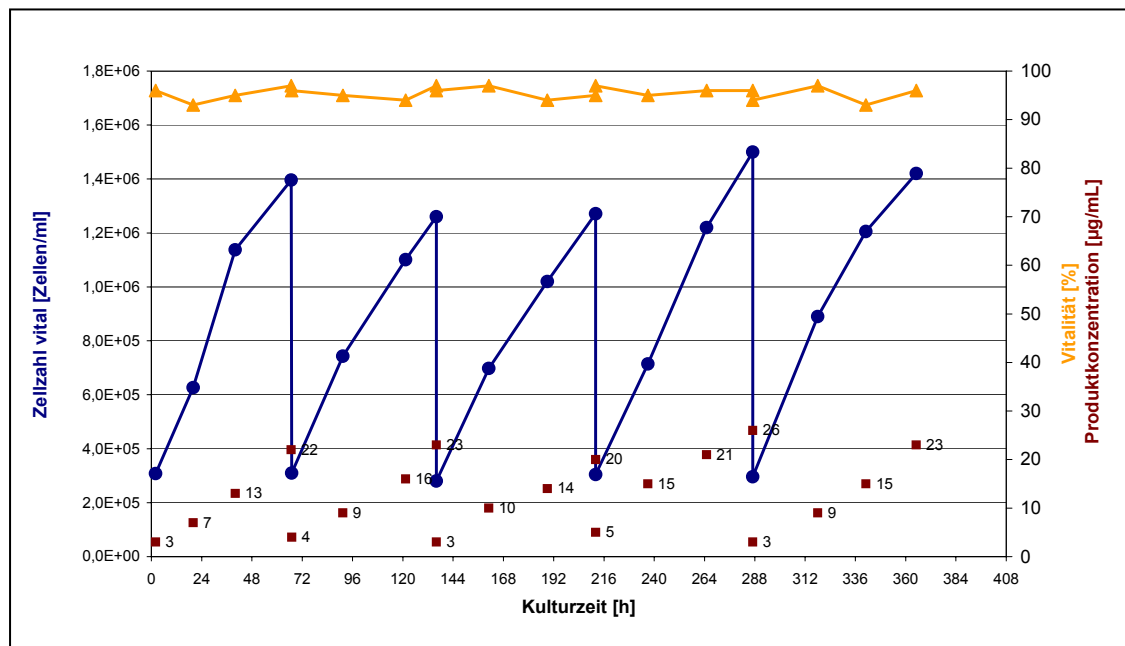


Abbildung 3.22: Kultivierung von HT1080 GA-EPO Zellen im *repeated* Batch Modus. Darstellung von Zellzahl, Vitalität und Produktkonzentration während der Kultivierung.

Die Zellen wuchsen in den fünf Einzelbatches mit einer durchschnittlichen Wachstumsgeschwindigkeit von $0,02 \pm 0,004 \text{ h}^{-1}$ von ca. $3 \cdot 10^5$ Zellen / ml auf 1,2 bis $1,5 \cdot 10^6$ Zellen / ml. Damit die Zellen nach einem Batch ohne lag-Phase weiterwuchsen, wurde jeweils am Ende der exponentiellen Phase, nach 2,7 bis 3,3 Tagen geerntet. Die EPO Konzentrationen zum Erntezeitpunkt lagen zwischen 20 und 26 $\mu\text{g/ml}$. Die Anteile an vollständig terminal sialylierten N-Glycanen betrugen zum Erntezeitpunkt zwischen 58 und 52 %.

Da für fünf *repeated batch* Prozesse, wie in diesem Beispiel, nur einmal die Aufbau- und Abbauzeiten für den Bioreaktor anfallen, ist die Raum-Zeitausbeute höher ist als beim reinen Batch Prozess.

3.3.3 Produktion von GA-EPO mit einem Perfusionsprozess

Eine noch höhere Ausbeute als bei *repeated batch* Prozessen kann durch einen Perfusionsprozess erreicht werden. Dazu wird bei Zellrückhaltung kontinuierlich geerntet und zum Ausgleich frisches Medium zugeführt. Somit können Nährstofflimitierungen und gleichzeitig Akkumulationen von Ammonium, Lactat und Glycosidasen vermieden werden. Zudem kann bei deutlich höheren Zelldichten als bei Batchprozessen kultiviert werden.

Da die qualitätsrelevanten Parameter in die Prozessführung implementiert werden sollen, soll zunächst eine Schnellmethode für die Probenvorbereitung zu ihrer Bestimmung entwickelt werden. Zusätzlich soll die Etablierung des Perfusionsmoduls durchgeführt werden. Anschließend muss das *proof of concept* der Kultivierungsstrategie gezeigt werden sowie die Robustheit des Prozesses unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen.

3.3.3.1 Schnellmethode zur Probenvorbereitung für die Bestimmung der qualitätsrelevanten Parameter

Die herkömmliche Methode zur Aufreinigung und Probenvorbereitung bis hin zur Analyse der N-Glycane von EPO dauert 2-3 Tage. Abbildung 3.23 zeigt allgemein die dazu notwendigen Schritte.

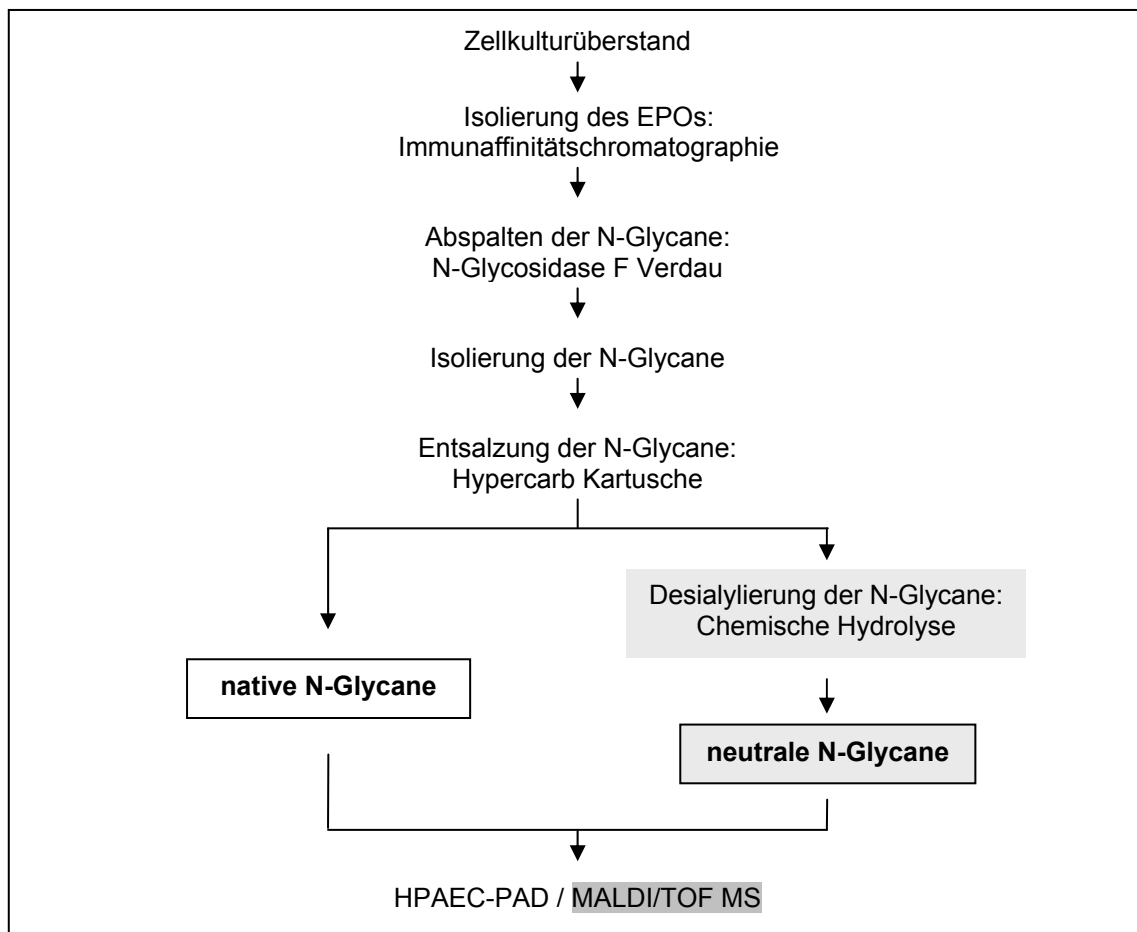


Abbildung 3.23: Schema der Aufreinigung und Probenvorbereitung bis hin zur Analyse von EPO. Die grau hinterlegten Schritte gehören nicht zur Schnellmethode, sondern zeigen die Möglichkeit zur ausführlicheren Glycananalytik mit der gleichen Probenvorbereitung.

Statt die herkömmliche Methode der Immunaффinitätschromatographie durchzuführen, wird auf die Hilfsmittel Pumpen, UV-Spektrometer und Autosampler verzichtet. Anstelle der Pumpen wurde Spitzen eingesetzt, die mit der Hand bedient werden. So kann das notwendige Volumen der verschiedenen mobilen Phasen verringert und die benötigte Zeit für die Immunaффinitätschromatographie von 1,5 h auf 30 min reduziert werden. Das Eluat aus der Chromatographie wird mit Hilfe von Zentrifugalfiltrations-Röhrchen konzentriert (20 min) und mit N-Glycosidase F verdaut. Dabei ist die Konzentration des Enzyms derart erhöht (auf 20 U PNGase F pro 10 µg Protein), dass nach einer Inkubationszeit von 1,5 h anstatt nach 12 h die N-Glycane vollständig abgespalten sind. Bei der Durchführung der Schnellmethode wird die Proteinmenge abgeschätzt. Die Kontrolle über die

Vollständigkeit des Verdaus erfolgt mittels SDS PAGE / Western Blot. Bei der Durchführung der Schnellmethode wird das Ergebnis dieser Kontrolle nicht abgewartet. Die Isolierung der abgespaltenen N-Glycane erfolgt mit Hilfe einer C₁₈ Reversed Phase Kartusche innerhalb von 20 min, anstelle von zwei Proteinfällungen mit EtOH und anschließendem Trocknen des EtOHs durch Lyophilisierung (*Dauer: ca. 6 h*). Mittels einer Hypercarb Kartusche werden die N-Glycane entsalzt (*ca. 20 min*). Es folgt die Lyophilisierung der Proben für ca. 2,5 h, an die sich die HPAEC PAD Analyse anschließt. Inklusive der Berechnung des Anteils an vollständig terminal sialylierten Strukturen dauert dies 1,5 h. Der Vergleich der HPAEC PAD Chromatogramme derselben Probe, die einmal herkömmlich und einmal mit der Schnellmethode vorbereitet wurde, zeigte, dass die Methoden austauschbar sind (*Daten nicht gezeigt*).

Die Schnellmethode kann also innerhalb von 7-7,5 h durchgeführt werden. D. h. wenn morgens die Probennahme erfolgt, liegen am Ende des Arbeitstages Informationen über die Sialylierung und das *glycan pattern* vor. Bei einer Abweichung von der gesetzten Spezifikation wird die Produktionsphase unterbrochen, Einfluss auf die Kultivierung, z. B. durch die Erhöhung der Perfusionsrate, genommen und die Produktion wieder begonnen, wenn die Spezifikation wieder eingehalten wird. Die Erntebatches können mit derselben Methode zeitnah analysiert werden.

Die Analyse des *glycan patterns* und der vollständigen terminalen Sialylierung der N-Glycane des GA-EPOs aus dem Bioreaktor sowie der Ernte wurden als Spezifikationen in die Prozessführung implementiert.

3.3.3.2 Das Perfusionsmodul

Bei den Perfusionsmodulen wird zwischen den Membranmodulen (*cross flow Modul und spinn filter Modul*) und den Modulen, die mit der Gravitationskraft arbeiten (*settler, kontinuierliche Zentrifugen und Ultraschallseparatoren*), unterschieden (Woodside 1998). Für den zu entwickelnden Prozess war als Perfusionsmodul ein *cross flow* Modul vorgegeben, um bei einem *scale up* die Erfahrungen aus dem Perfusionsprozess I zu nutzen. Diese beruhen auf einer *cross flow* Technologie im 100 l Maßstab. Das zuvor benutzte *cross flow* Modul „Prostak“ der Fa. Millipore kann jedoch im kleineren Maßstab nicht eingesetzt

werden. Daher wurde ein kleineres Modul mit einem geringeren Membranabstand gewählt. Der Consep-Filterhalter der Fa. Membrapur ist mit zwei Durapore-Membranen mit einer Porenweite von 0,65 µm der Fa. Millipore bestückt (*entspricht der Membran im Prostak*). Die zur Verfügung stehende Austauschfläche beträgt 0,03 m². In mehreren Versuchsreihen wurde festgestellt, dass eine Zirkulationsgeschwindigkeit von 15 l / h gut geeignet ist (*Daten nicht gezeigt*). Die HT1080 GA-EPO Zellen setzen sich nur zu einem geringen Maße im Perfusionsmodul ab und weisen über einen Zeitraum von mehr als 7 Tage eine Vitalität von über 94 % auf, somit wurden sie in diesem Zeitrahmen durch die Perfusion nicht geschädigt. Der Filtratfluss durch das Perfusionsmodul wird mit einer Schlauchpumpe reguliert, die nur das eingestellte Filtratvolumen pro Zeiteinheit durch die Membran fließen lässt, so dass die Membranverstopfung geringer ist, als es bei einem freien Fluss der Fall wäre und die Medienausnutzung gezielt geregelt werden kann.

3.3.3.3 ***Proof of concept* der Perfusionsstrategie**

Der neu zu entwickelnde Perfusionsprozess (*Perfusionsprozess II*) soll mit einer Perfusions/Bleeding-Strategie durchgeführt werden. Dabei befinden sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase und die Zellzahl wird durch Bleeding konstant gehalten. Das Gesamtkonzept der Perfusions/Bleeding-Strategie mit der auf den qualitätsrelevanten Parametern basierenden Prozessführung wird mit einem 10 l Rührkesselbioreaktor mit einem *cross flow* Perfusionsmodul getestet. Der Aufbau ist im Kapitel 2.2.4.2 beschrieben. Während der Kultivierung im Bioreaktor wird der pH Wert bei 7,0 und der Sauerstoffpartialdruck auf 40 % Luftsättigung eingestellt.

Das *proof of concept* der Perfusionsstrategie erfolgt mit einer für einen Perfusionsprozess niedrigen Zellzahl von ca. 1 bis $2 \cdot 10^6$ Zellen / ml, um mit dem System flexibel auf sich ändernde Kultivierungsverhältnisse reagieren zu können. Zudem bauen sich eventuelle Änderungen bei niedrigeren Zellzahlen langsamer auf. Bei der täglichen Probenahme aus Bioreaktor und Ernte wird jeweils 50 ml Suspension entnommen. Es werden die Zellzahl (*vital und gesamt*), die Glucose-, Lactat-, Glutamin-, und Ammoniumkonzentration, der pH Wert und die Produktkonzentration ermittelt. Zur Überprüfung der

qualitätsrelevanten Parameter in Bioreaktor und Ernte wird mit der morgendlichen Probe die Schnellmethode durchgeführt. Ein Erntebatch wird dabei definiert als die akkumulierte Ernte von ca. 24 Stunden. Dazu wird der Erntebag nach jeder morgendlichen Probennahme gewechselt. Während der Produktion wird der Erntebag bei 4 °C gelagert, nach der Abkopplung bei -20 °C tiefgefroren, um die Aktivität eventuell vorhandener Proteasen und Glycosidasen einzuschränken. Durch die Überprüfung der qualitätsrelevanten Parametern können nach der *guideline* Q7A („*Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical Ingredients*“) der ICH (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) die Einzelbatches der Ernte zu einem Gesamtbatch gepoolt werden, wenn jeder einzelne Batch den Spezifikationen entspricht. Solange die qualitätsrelevanten Parameter die Spezifikation von mindestens 40 % vollständig terminal sialylierter N-Glycane einhalten und das *glycan pattern* keine Besonderheiten aufweist, wird ausgehend von den Erfahrungen in Spinnerkulturen mit einer Rate perfundiert, die die Lactatkonzentration bei ca. 1 g/l hält. Bei dieser Konzentration trat nach Passagierung der Zellen keine Lag-Phase auf, so dass die Kultivierungsumstände als geeignet angesehen werden können. Die Vitalität betrug unter diesen Kultivierungsbedingungen immer über 90 %. Eine Folge niedriger Vitalität wäre das Verstopfen der Membranen durch Zelltrümmer. Derartige technische Probleme mit dem *cross flow* Modul sollen durch die Begrenzung der Lactatkonzentration umgangen werden. Durch ein Membranfouling, der Bildung einer Deckschicht von Zellbestandteilen auf der Crossflowmembran, würde die mögliche Perfusionsrate herabgesetzt. Durch die geringere Perfusionsrate würden die Zellen schlechter versorgt, so dass die Vitalität weiter abnähme. Bei einer solchen Kaskade kann der Prozess nur nach Wechsel des Perfusionsmoduls weitergeführt werden.

Für das *proof of concept* wurden cryokonservierte Zellen aus der *working cell bank* nach der Revitalisierung in einer T-Flasche kultiviert und dann in Spinnerflaschen immer weiter expandiert. Für die Vorkultur wurde daraus ein 2 l Bioreaktor inokuliert ($3 \cdot 10^5$ Zellen / ml). Dieser wurde in drei 2 l Reaktoren

gesplittet, aus denen der 10 l Perfusionsreaktor angeimpft wurde. In Abbildung 3.24 ist die Kultivierung im Perfusionsreaktor abgebildet.

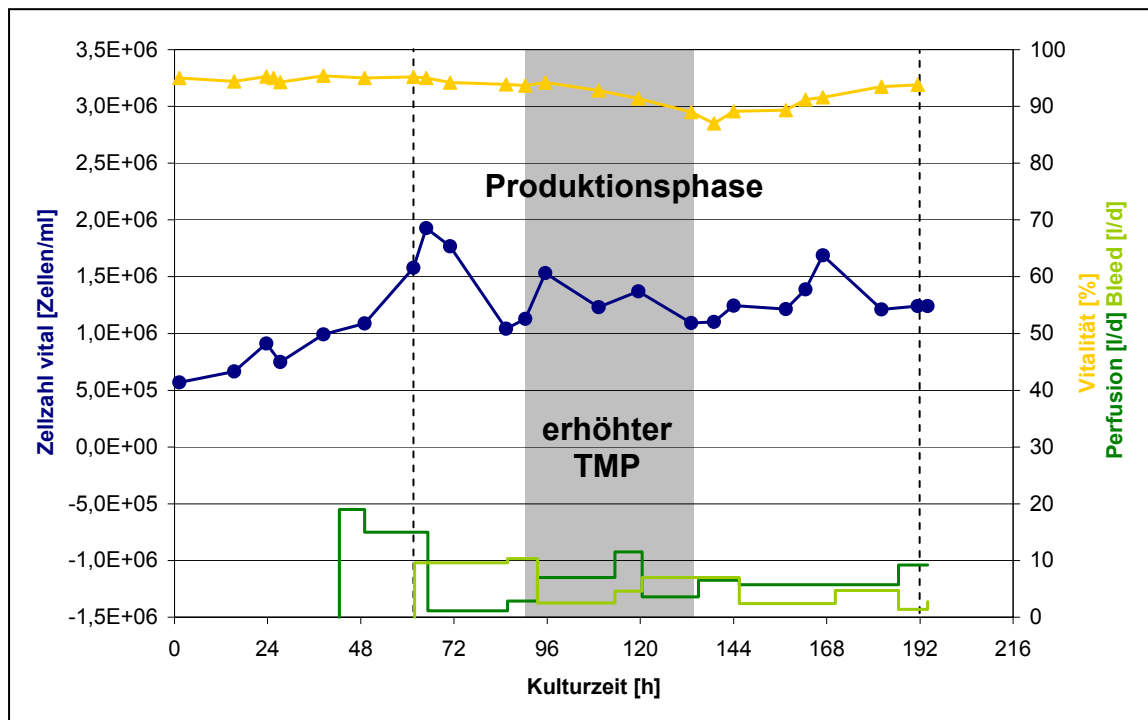


Abbildung 3.24: Kultivierung von GA-EPO HT1080 Zellen im 10 l Bioreaktor mit der Perfusions-Bleeding Strategie. Während der Produktionsphase wurde die Zellzahl zwischen $1 \cdot 10^6$ und $2 \cdot 10^6$ Zellen / ml konstant gehalten. Der grau hinterlegte Bereich kennzeichnet einen Versuch mit erhöhtem Transmembrandruck (TMP), der später beschrieben wird.

Der Bioreaktor wurde mit $5,7 \cdot 10^5$ Zellen / ml und einer Lactatkonzentration von 0,53 g / l angeimpft. Nach eineinhalb Tagen wurde mit der Perfusion begonnen, da die Lactatkonzentration auf 1,17 g / l gestiegen war. Nach zweieinhalb Tagen Kultivierung war die Produktionszelldichte ($1,58 \cdot 10^6$ Zellen / ml) erreicht. Mit den Proben aus Reaktor und Ernte wurden von nun an die qualitätsrelevanten Parameter mit der Schnellmethode analysiert. Während der gesamten Produktionsphase konnten die Parameter Lactatkonzentration und Zellkonzentration in den gesetzten Grenzen gehalten werden. Die Vitalität war während des gesamten Versuches bis auf einen kurzen Zeitraum zwischen 133 und 162 h über 90 %. Während des beschriebenen Zeitraums sank die Vitalität aufgrund eines zusätzlich durchgeführten Versuchs, der in Kapitel 3.3.3.4 beschrieben wird.

Der Mediumaustausch lag während der Produktionsphase im Mittel bei einem Reaktorvolumen, davon entfielen ca. 7,5 l auf die Ernte und ca. 2,5 l auf das Bleeding. Insgesamt wurden während der sechs Produktionstage 600 mg GA-EPO produziert.

Für eine Perfusionskultivierung gibt es verschiedene Strategien. Zum einen kann die Perfusionsrate konstant gehalten werden, die Zellen wachsen nur solange die Versorgung mit Medium ausreichend ist und stellen bei Nährstofflimitierung weiteres Wachstum ein (*Perfusions-Anpassungs-Strategie*). Diese Umstellung vom Wachstums- auf reinen Erhaltungsstoffwechsel kann zu einem drastischen Abfall der Vitalität führen und ist nur sinnvoll, wenn die Zellen in der stationären Phase besser produzieren als wachstumsgekoppelt (de la Broise 1992). Werden die Zellen in der stationären Phase jedoch nicht optimal versorgt, kann eine verringerte Antennarität oder eine geringe Sialylierung die Folge sein. Bei der Perfusions/Bleeding-Strategie wird die Zellzahl über das *bleeding* auf einem Level konstant gehalten, den das System mit ca. 75 % Auslastung optimal versorgen kann. Die Zellen befinden sich dabei in der exponentiellen Wachstumsphase. Nachteilig wirken sich hier schwankende Wachstumsgeschwindigkeiten aus, da das *bleeding* und die Perfusionsrate immer wieder daran angepasst werden müssen. Ein solcher Prozess ist eventuell bei der Validierung problematisch.

Für die Entwicklung eines Produktionsprozesses für GA-EPO mit HT1080 GA-EPO Zellen wurde die Perfusions/Bleeding-Strategie angewendet, um durch optimale Versorgung der Zellen ein hochwertiges Produkt zu erhalten. Die wachstumsgekoppelte Produktion von GA-EPO, wie aus Abbildung 3.13 Seite 85 besonders bei den Zellen kultiviert in DMEM F12 PDM 3 ersichtlich ist, spricht gegen die Kultivierung nach der Perfusions-Anpassungs-Strategie.

Zur Analyse der qualitätsrelevanten Parameter wurden jeweils ca. 200 µg GA-EPO mit der Schnellmethode über Immunaффinitätschromatographie aufgereinigt, die N-Glycane enzymatisch abgespalten, gewonnen und entsalzt. Anschließend erfolgte ihre Analyse mittels nativer HPAEC PAD Chromatographie. Die Ergebnisse aus der täglichen Analyse der qualitätsrelevanten Parameter aus der Reaktorprobe sind in Abbildung 3.25 gezeigt.

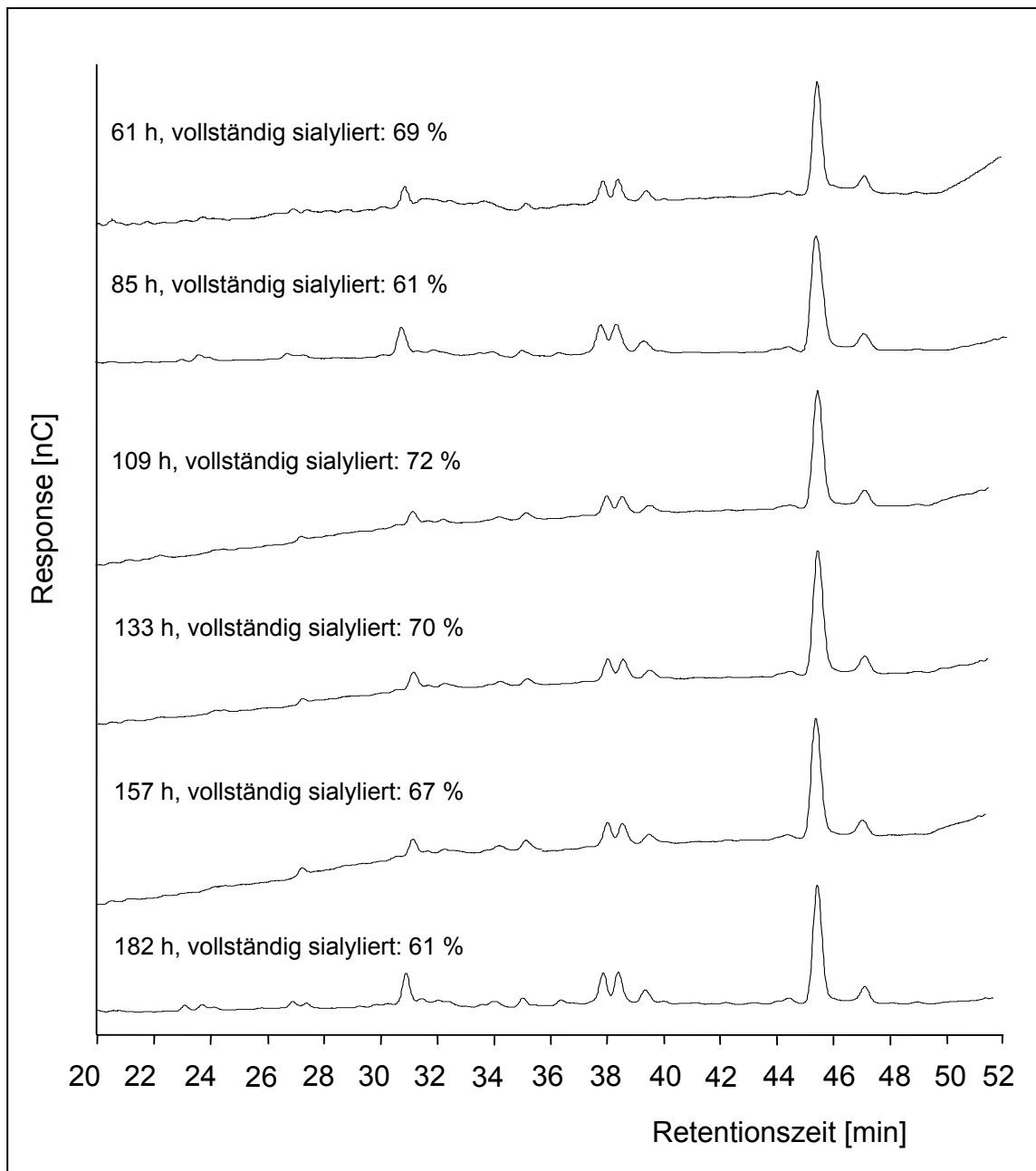


Abbildung 3.25: HPAEC PAD Analysen der nativen GA-EPO N-Glycane aus dem Bioreaktor im Verlauf der Perfusionskultivierung. Dargestellt sind die Proben aus der Produktionsphase, die mit Hilfe der Schnellmethode innerhalb eines Arbeitstages analysiert wurden. Peak-Struktur Zuordnung: siehe Seiten 48 und 51.

Das GA-EPO aus dem Bioreaktor weist über den gesamten Produktionszeitraum mit 56 bis 72 % hochsialylierte N-Glycane auf. Die gesetzte Spezifikation von mindestens 40 % vollständig terminal sialylierter N-Glycane wurde eingehalten. Die *N-glycan pattern* der einzelnen Proben weisen keine Unterschiede untereinander und zum GA-EPO aus Batchprozessen auf.

Abbildung 3.26 zeigt die HPAEC PAD Ergebnisse der nativen N-Glycane des GA-EPOs aus der Ernte, die während der Produktionsphase gesammelt wurde.

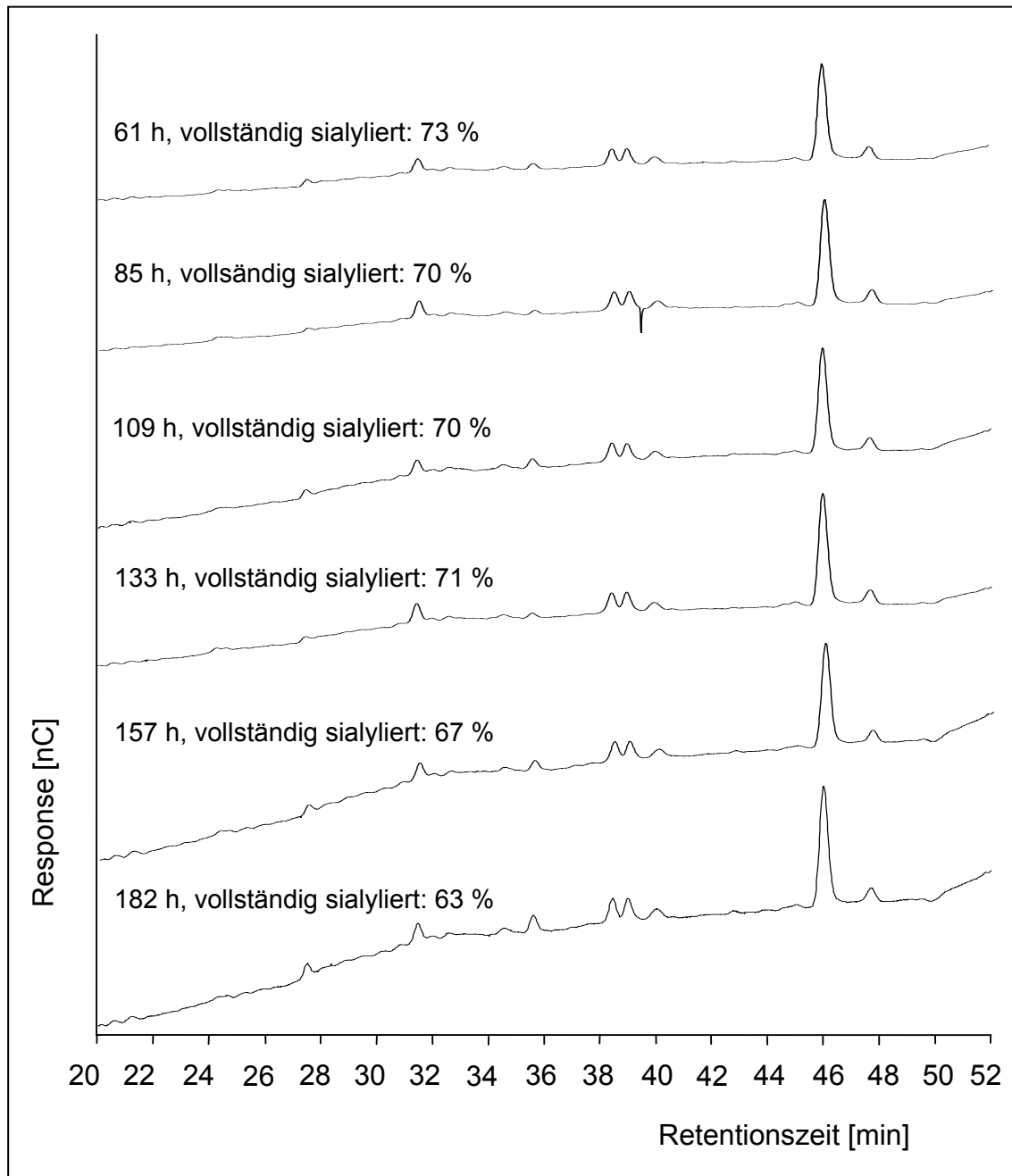


Abbildung 3.26: HPAEC PAD Analysen der nativen GA-EPO N-Glycane aus der Ernte im Verlauf der Perfusionskultivierung. Dargestellt sind die Proben aus der Produktionsphase, die mit Hilfe der Schnellmethode innerhalb eines Arbeitstages analysiert wurden. Peak-Struktur Zuordnung: siehe Seiten 48 und 51.

Das GA-EPO aus der Ernte, die jeweils etwa 24 h gesammelt wurde, zeigt mit 63 bis 73 % vollständig terminal sialylierten N-Glycanen ebenfalls durchgehend eine Sialylierung, die weit über den in der Spezifikation geforderten 40 % liegt.

Das *N-glycan pattern* ist über die gesamte Kultivierung homogen. Durch die Einhaltung der Spezifikation in den Erntebatches ist es gemäß der *guideline Q7A* („*Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical Ingredients*“) der ICH möglich, die einzelnen, definierten Erntebatches zu einem Gesamtbatch zu mischen. Das gewählte Design für den Perfusionsprozess II ist demnach sehr gut für die Produktion eines hochwertigen GA-EPOs geeignet.

Die *N-glycan pattern* und die Anteile an vollständig terminal sialylierten N-Glycane entsprechen bei allen Ernteproben den Spezifikationen. Um den Einfluss der Proteolyse bzw. von Sialidasen zu überprüfen, sind in Tabelle 3.7 die Anteile vollständig terminal sialylierter N-Glycane in Bioreaktor und Ernte im Verlauf der Kultivierung zusammengefasst und gegenübergestellt.

Tabelle 3.7: Vollständig terminale Sialylierung der N-Glycane im Verlauf der Perfusionskultivierung in Bioreaktor und Ernte.

Produktionstag		vollständig sialylierte N-Glycane im Bioreaktor [%]	vollständig sialylierte N-Glycane in der Ernte [%]
1	61 h	69	73
2	85 h	61	70
3	109 h	72	70
4	133 h	70	71
5	157 h	67	67
6	182 h	61	63

Der Vergleich der Anteile vollständig terminal sialylierter N-Glycane zwischen Bioreaktor und Ernte zeigt, dass es zwischen ihnen keine signifikanten Unterschiede gibt. Die gewählten Kultivierungsbedingungen und die Lagerung bei 4 °C über 24 h ermöglichen die Herstellung eines Produkts mit einer deutlich über der Spezifikation liegenden Sialylierung. Eventuell vorhandene Sialidasen scheinen bei dieser Lagerung keinen Einfluss auf die Produktqualität zu haben.

Die gewählte Strategie liefert damit ein *bulk harvest* mit einer hohen Sialylierung, die der Spezifikation entspricht. Die Strategie der täglichen Analyse der qualitätsrelevanten Parameter aus Bioreaktor und Ernte war erfolgreich. Das *proof of concept* der Perfusions/Bleeding-Strategie mit einer

auf den qualitätsrelevanten Parametern basierenden Prozessmonitoring konnte nachgewiesen werden.

3.3.3.4 Robustheit des Prozesses unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen

Der Prozess soll bei verschiedenen Kultivierungsbedingungen durchgeführt werden, einerseits um die Stabilität der Produktion und der qualitätsrelevanten Parameter in Problemsituationen zu kennen und andererseits um mit einer höheren Zellzahl zu einer höheren Ausbeute zu gelangen. Diese Untersuchungen zeigen die Robustheit des Prozesses. Die Untersuchungen zur Robustheit sind notwendig, um die Validierbarkeit des Prozesses abzusichern.

Die Auswirkungen eines erhöhten Transmembrandrucks (*trans membran pressure* TMP), erhöhter Medienausnutzung und Einfluss der Lactatkonzentration, einer Langzeitkultivierung im Perfusionsmodus und der Kultivierung bei erhöhter Zellzahl werden im folgenden gezeigt. Essentiell ist dabei die Schnellmethode zur Probenvorbereitung zur N-Glycananalyse um Änderungen der qualitätsrelevanten Parameter schnell zu erfassen und die Reaktionen der Kultivierung zu verstehen.

Erhöhter Transmembrandruck

Da es im Verlauf von Perfusionsprozessen durch Verstopfung des Perfusionsmoduls zu erhöhtem Transmembrandruck kommen kann, wurde ein solcher künstlich herbeigeführt, um die Folgen zu beobachten. Mit Hilfe einer Schlauchklemme wurde der Druck am Zirkulationsausgang des Crossflow-Moduls zunächst langsam, innerhalb von 10 h von 100 auf 200 mbar erhöht, 13 h bei 200 mbar gehalten und dann innerhalb von 5 h auf 300 mbar erhöht. Nach ca. 18 h wurde der Transmembrandruck durch Wechsel des Perfusionsmoduls wieder auf 100 mbar zurückgesetzt. Abbildung 3.26 zeigt den Verlauf des Transmembrandrucks und der Vitalität während der Kultivierung. Sie stellt den grau hinterlegten Ausschnitt aus den in Abbildung 3.24 gezeigten Kultivierungsdaten dar.

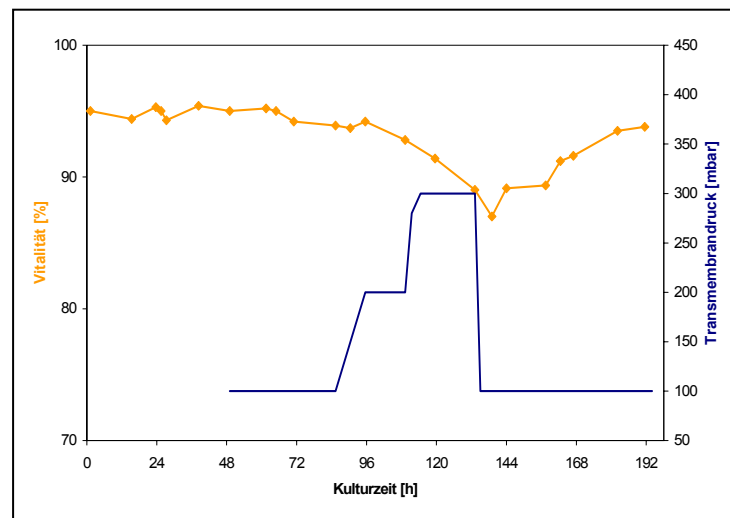


Abbildung 3.26: Einfluss eines erhöhten Transmembrandrucks auf die Vitalität während der Perfusionskultivierung mit dem Consep Filterhalter. Die zu diesem Versuch gehörenden Kultivierungsdaten sind in Abbildung 3.24 gezeigt.

Bei einem Transmembrandruck von 200 mbar für ca. 23 h wurde die Vitalität vorerst kaum beeinflusst. Durch die Erhöhung des Transmembrandrucks für die Dauer von 18 h auf 300 mbar fiel die Vitalität auf 89 %. Nach dem Wechsel des Crossflowmoduls, mit dem wieder ein Transmembrandruck von 100 mbar gewährleistet war, sank die Vitalität weiter bis auf 87 %. Der weitere Abfall der Vitalität ist wahrscheinlich die Folgeerscheinung des zuvor auf die Zellen eingewirkten Scheerstress. Nach 47 h Kultivierung unter den Ausgangsbedingungen erholte sich die Zellpopulation und die Vitalität stieg wieder auf den Ausgangswert von 94 %.

Nach dem Öffnen des Crossflowmoduls, mit dem der Versuch der Transmembrandruckerhöhung durchgeführt wurde, war ein sehr viel stärkerer Zellbelag auf den Membranen zu sehen als es bei Membranen der Fall war, die bei niedrigen Transmembrandrücken benutzt wurden. Wenn im Verlauf der Benutzung des Crossflowmoduls die Membranen zunehmend mit einer Schicht aus Zellen und Zelldebris überlagert sind, erhöht sich der Transmembrandruck immer schneller. Die Zellen verengen den Membrankanal. Da jedoch durch die Pumpe immer das gleiche Volumen Zellsuspension pro Zeiteinheit durch die Kanäle gepumpt wird, fließt die Suspension schneller. Dies führt zu einer Erhöhung des Transmembrandrucks und gleichzeitig der Krafteinwirkung auf

die Zellen in Richtung Membran. Dadurch lagern sich noch mehr Zellen auf der Membran an, die den Kanal weiter verengen. Beide Effekte verstärken sich gegenseitig, so dass der Transmembrandruck innerhalb einer kurzen Zeit, z. B. über Nacht stark ansteigen kann. Folgen des erhöhten Transmembrandrucks sind höherer Scheerstress für die Zellen beim Durchströmen der verengten Kanäle, verstärkte Deformation von Zellen an den Membranporen gefolgt von Scheerstress (Maioresella B. 1991) und wahrscheinlich Erhöhung der Konzentration proteolytischer Enzyme durch in der Deckschicht unterversorgte und absterbende Zellen. Der höhere Scheerstress kann zum verstärktem Absterben von Zellen führen, ebenso können gestresste Zellen in ihrer Proteinbiosynthese gestört sein.

Die *N-glycan pattern* des GA-EPOs aus dem Bioreaktor sind in Abbildung 3.25 auf Seite 109 zu sehen. Tabelle 3.8 zeigt eine Übersicht über die im Versuch aufgebauten Transmembrandrücke und die Folgen für die Vitalität und den Anteil an vollständig terminal sialylierten N-Glycane des GA-EPOs im Bioreaktor.

Tabelle 3.8: Übersicht über den Transmembrandruck (TMP) und die Folgen für Vitalität und den Anteil vollständig terminal Sialylierter N-Glycane.

Produktionstag		TMP [mbar]	Vitalität [%]	vollständig terminal sialylierte N-Glycane im Bioreaktor [%]
1	61 h	100	95	69
2	85 h	100	94	61
3	109 h	200	93	72
4	133 h	300	89	70
5	157 h	100	87	67
6	182 h	100	94	61

Der Anteil an vollständig terminal sialylierten N-Glycanen sank infolge der Transmembrandruckerhöhung nicht und lag stets oberhalb der geforderten Spezifikation.

Die Erhöhung des Transmembrandrucks für 46 h hat keine bleibenden Auswirkungen auf die Kultur. Bei einer länger andauernden Druckerhöhung wären Folgen jedoch nicht ausgeschlossen, wenn die Vitalität der Kultur

eventuell soweit absänke, dass sie sich nicht wieder erholen könnte. Während eines Produktionsprozesses ist der Reaktor nur über Nacht, d.h. max. 14 h unbeaufsichtigt. Eine Erhöhung des Transmembrandrucks bis 300 mbar über diesen Zeitraum verursacht keine bleibenden Schäden an der Zellkultur, da sich das System als rückführbar erwies. Der Produktionsprozess ist somit hinsichtlich des Transmembrandrucks robust.

Kultivierung bei höherer Mediumausnutzung

Bei Produktionsprozessen ist die Kultivierung bei möglichst hoher Mediumausnutzung erwünscht, dabei werden die Kosten gesenkt und das Aufarbeitungsverfahren aufgrund der höheren Produktkonzentration und geringeren Volumina erleichtert. Die mögliche Mediumausnutzung bei einer Kultivierung mit der Perfusions/Bleeding-Strategie ist beschränkt durch die Nährstoffkonzentrationen im Medium, da eine Kultivierung bei Limitierungen aufgrund der möglichen Folgen für die Biosynthese der Zellen unerwünscht ist, sowie der Akkumulation von Zellabfallprodukten und Glycosidasen. In den folgenden Versuchen zur Mediumausnutzung wurde die Konzentration des leicht zu erfassenden Parameters Lactat als Indikator für verschiedene Kultivierungsumstände benutzt.

Abbildung 3.26 zeigt zwei Kultivierungen nach der Perfusions/Bleeding-Strategie, bei denen durch die Perfusionsrate die Lactatkonzentration jeweils für einen bestimmten Versuchszeitraum bei verschiedenen Werten gehalten wurde.

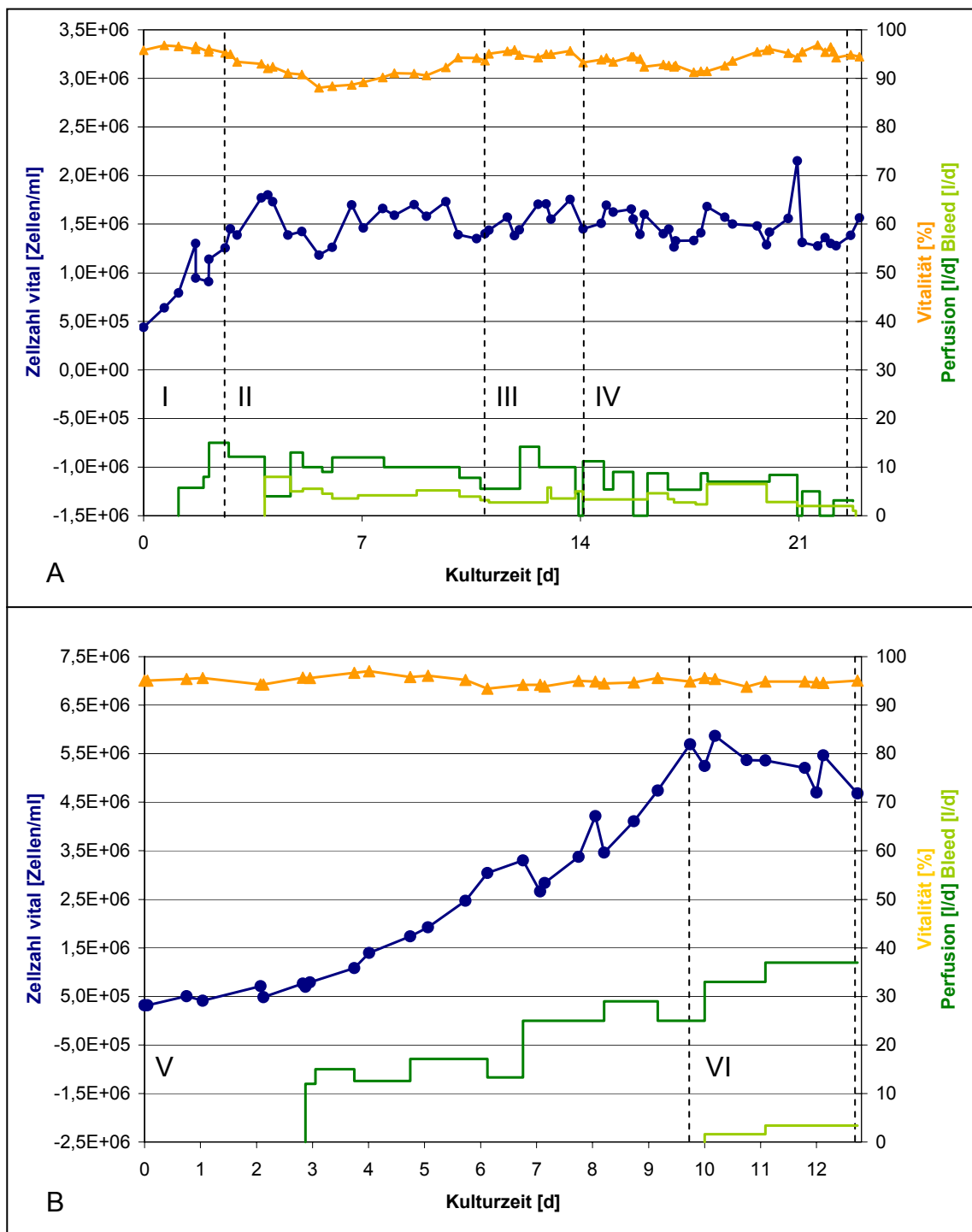


Abbildung 3.26: Kultivierung mit der Perfusions/Bleeding-Strategie bei verschiedenen Lactatkonzentrationen. Phase I und V: Anzucht, Phase II: <1,25 g / l Lactat, Phase III: 1,25 g / l Lactat, Phase IV: 1,5 g / l Lactat, Phase VI: 2 g / l Lactat.

Für beide Kultivierungen wurden analog zum vorherigen Versuch jeweils cryokonservierte Zellen aus der *working cell bank* nach dem Auftauen über Nacht in einer T-Flasche kultiviert und dann in Spinnerflaschen immer weiter

passagiert, bis die Zellzahl zur Inokulation eines 2 l Bioreaktors ausreichte. Dieser wurde in drei 2 l Reaktoren gesplittet aus denen der 10 l Perforationsreaktor angeimpft wurde. Passagierungen der Vorkulturen erfolgten stets während der exponentiellen Wachstumsphase. Nach einer kurzen Anzuchtsphase (I) wurde die Zellzahl für die Produktionsphase von Lauf A durch das Bleeding zwischen 1 und $2 \cdot 10^6$ Zellen / ml gehalten. Für ca. 9 Tage wurde in Phase II die Lactatkonzentration durch die Perfusion auf unter $1,25$ g / l eingestellt. In der darauf folgenden Phase III war die Lactatkonzentration für ca. 3 Tage bei ca. $1,25$ g / l, für Phase IV wurden ca. $1,5$ g / l Lactat für ca. 9 Tage eingestellt. Für die Produktionsphase von Lauf B wurde eine Zellzahl von ca. $5,5 \cdot 10^6$ Zellen / ml eingestellt. Nach der Anzuchtsphase (V) begann eine ca. 4-tägige Produktionsphase, bei der die Lactatkonzentration ca. 2 g / l betrug. Bei Lauf A lag die Vitalität während der Kultivierung bei über 90 %. Das notwendige Bleeding zur Erhaltung der Zellkonzentration war bei ca. $1,5 \cdot 10^6$ Zellen / ml quasi konstant. Daraus lässt sich eine über den gesamten Kultivierungszeitraum gleichbleibende Wachstumsgeschwindigkeit ($\mu = 0,014 \text{ h}^{-1}$) errechnen, die nicht von den Kultivierungsbedingungen bei den getesteten Lactatkonzentrationen bis $1,75$ g / l beeinflusst wurde. Ob die Kultivierungsbedingungen bei einer Lactatkonzentration von 2 g / l die Wachstumsgeschwindigkeit beeinflussen, kann durch die Kultivierung B nicht beurteilt werden, da schon die Wachstumsgeschwindigkeit in der Anzuchtsphase deutlich langsamer war als bei Kultivierung A ($\mu_V = 0,014 \text{ h}^{-1}$, $\mu_I = 0,027 \text{ h}^{-1}$).

Unter den Kultivierungsbedingungen von Lauf A wurden bei jeder Lactatkonzentration durchschnittlich 122 mg GA-EPO pro Tag produziert. Das entspricht 81 mg / (Tag $\cdot 10^{10}$ Zellen). In Lauf B wurden während der Produktionsphase durchschnittlich 425 mg GA-EPO pro Tag produziert. Die Produktivität war mit 77 mg / (Tag $\cdot 10^{10}$ Zellen) in der gleichen Größenordnung wie unter den Kultivierungsbedingungen von Lauf A. Daraus kann geschlossen werden, dass weder die Kultivierungsumstände bei einer Lactatkonzentration von ca. 2 g / l, noch die geringere Wachstumsgeschwindigkeit, noch die ca. 3,5 fache Zellkonzentration einen Einfluss auf die Produktivität haben.

Zur Beurteilung der qualitätsrelevanten Parameter wurden während der Kultivierungen die N-Glycane aus dem Bioreaktor und der Ernte täglich analysiert. Abbildung 3.27 zeigt für jede der verschiedenen Lactatkonzentrationen beispielhaft ein Chromatogramm der HPAEC PAD Analysen der nativen N-Glycane.

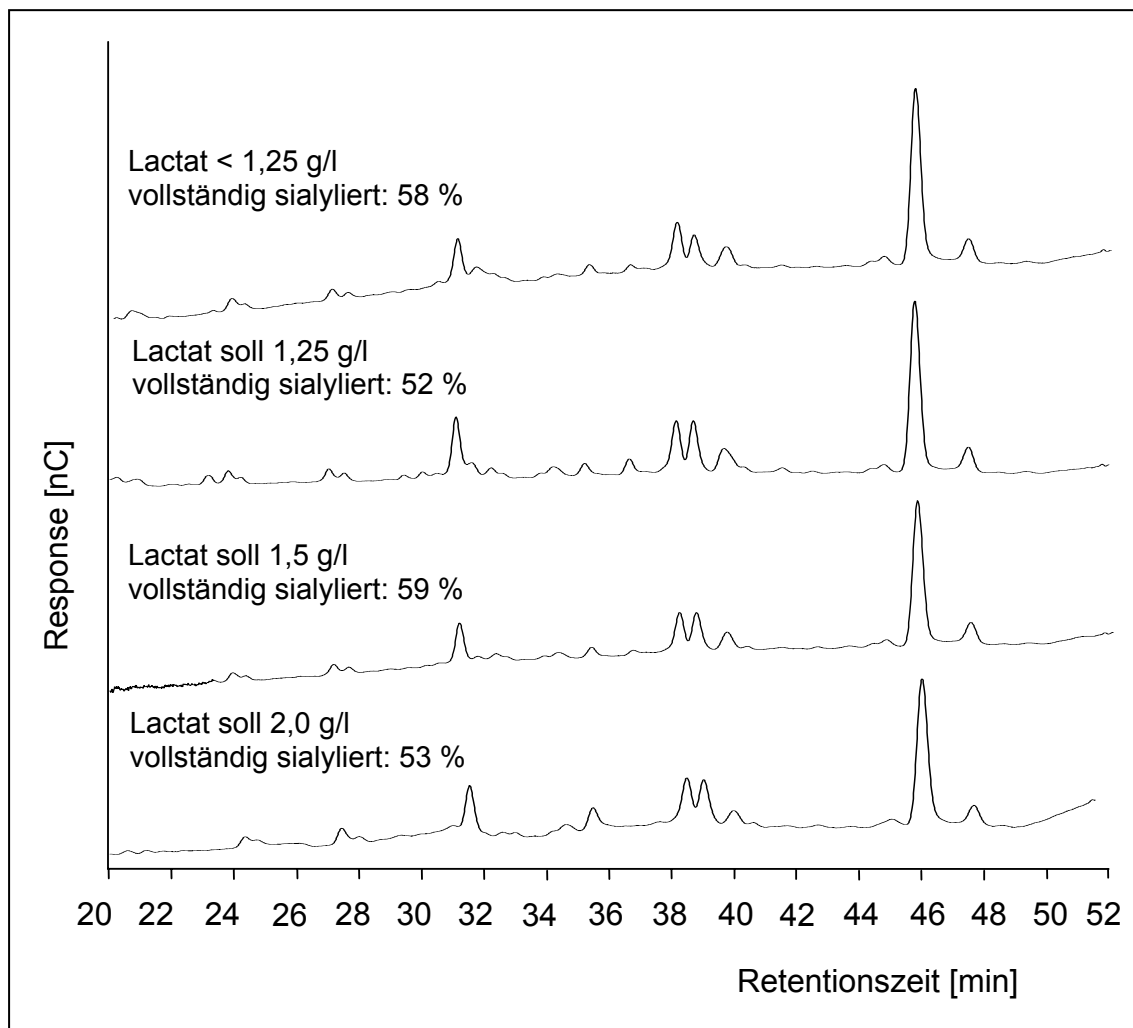


Abbildung 3.27: HPAEC PAD Analysen von nativen N-Glycanen des GA-EPOs kultiviert mit verschiedenen Lactatkonzentrationen aus Kultivierungen mit der Perfusions/Bleeding-Strategie. Peak-Struktur Zuordnung: siehe Seiten 48 und 51.

Die *glycan pattern* der nativen N-Glycane des GA-EPOs aus Kultivierungsphasen mit verschiedenen Lactatkonzentration sind vergleichbar. Tabelle 3.9 zeigt die Anteile der vollständig terminal sialylierten N-Glycane für alle Produktionstage.

Tabelle 3.9: Anteile an vollständig terminal sialylierten N-Glycanen von GA-EPO während der Kultivierungen bei verschiedenen Lactatkonzentrationen

Kulturzeit [d]	Versuchsbedingungen	vollständig sialyliert, Bioreaktor [%]	vollständig sialyliert, Ernte [%]
2,6	Lactat unter 1,25 g/l (Lauf A)	43	47
3,8		52	50
4,6		49	48
5,6		58	61
6,7		55	47
7,7		61	62
8,6		59	62
9,7		60	52
10,7		56	62
11,7	Lactat soll: 1,25 g/l (Lauf A)	57	60
12,6		51	47
13,7		52	49
14,7	Lactat soll: 1,5 g/l (Lauf A)	54	42
15,6		45	48
16,7		51	62
17,6		46	40
18,6		62	50
19,7		60	48
20,7		37	39
21,6		59	58
22,7		63	63
9,7	Lactat soll: 2,0 g/l (Lauf B)	53	46
10,8		65	61
11,8		49	49
12,7		53	50

Bei allen, bis auf eine Probe lag der Anteil an vollständig terminal sialylierten N-Glycanen innerhalb der Spezifikation von mindestens 40 %. Nur die Proben nach 20,7 Tagen aus Lauf A lagen mit 37 % (*Bioreaktor*) und 39 % (*Ernte*) außerhalb der Spezifikation. Der Erntebatch wäre nicht mit den anderen Erntebatches gepoolt und die Produktion unterbrochen worden. Das *glycan pattern* dieser Probe zeigte keine neuen Strukturen, die Morphologie der Zellen und die Mediumparameter Glucose, Glutamin, Glutamat und Ammonium waren

unauffällig. Ohne Änderung der Perfusion war der Anteil der vollständig terminal sialylierten N-Glycane bei der nächsten Probenahme nach ca. 24 h wieder innerhalb der Spezifikationen und die Produktion konnte wieder aufgenommen werden. Die weiteren Produktionstage zeigen, dass das System nach einer solchen Unterschreitung der Spezifikation wieder für die Produktion eingesetzt werden kann. Über die Zulässigkeit dieser Strategie muss mit den für die Zulassung zuständigen Behörden diskutiert werden.

Der Anteil der vollständig terminal sialylierten N-Glycane schwankte zwischen 43 und 65 %. Da die Sialylierung nicht alleine von der Lactatkonzentration beeinflusst wird, sondern auch von den anderen Kultivierungsumständen, für die die Lactatkonzentration ein Indikator ist, die jedoch nicht linear an die Lactatkonzentration gekoppelt sind, werden von den Anteilen vollständig terminal sialylierter N-Glycane aus jeder Kultivierungsphase die Mittelwerte gebildet und miteinander verglichen. Die Mittelwerte der vollständig terminal sialylierten N-Glycane aus dem Bioreaktor schwankten zwischen 53 und 55 %, die Mittelwerte aus der Ernte zwischen 50 und 54 %. Daraus kann geschlossen werden, dass sich die Kultivierungsbedingungen bei Lactatkonzentrationen bis zu 2 g / l nicht negativ auf die vollständige terminale Sialylierung auswirken. Da auch keine Auswirkungen auf das *glycan pattern* und die Produktivität festgestellt werden konnten, ist das Kultivierungssystem für die Kultivierung bis mindestens 2 g / l Lactat geeignet.

Die Erfahrungen bei Subkultivierungen in Spinnerflaschen zur Stammhaltung der GA-EPO produzierenden HT1080 Zellen zeigen, dass das Zellwachstum nach der Passagierung eine lag-Phase durchläuft, wenn die Lactatkonzentration vor dem Umsetzen höher als 1,5 g / l war. In den nicht geregelten Spinnerflaschen verursacht jedoch das Lactat ein Absinken des pH Wertes, da die Pufferkapazität des Mediums in diesem Fall nicht hoch genug ist. Wachstumsinhibierung infolge eines zu niedrigen pH Wertes verursacht durch Lactat wird in der Literatur häufig beschrieben (Glacken 1998; Glacken 1988). Der wachstumsinhibierende Effekt des Lactats ist in pH-stabilisierten Systemen bei Hybridoma-, CHO- und BHK- Zellen zum großen Teil auf die Erhöhung der Osmolarität zurückzuführen (Lao and Toth 1997); (Cruz *et al.* 2000). Die Empfindlichkeit gegenüber erhöhter Osmolarität ist

zelllinienabhängig und muss für jede Zelllinie neu bestimmt werden. Je nach Zelllinie werden dabei Lactatkonzentrationen zwischen 1,8 und 5,4 g / l angegeben (Glacken 1988; Cruz *et al.* 2000). Die Kultivierung der HT1080 GA-EPO Zellen war bei einer Lactatkonzentration von 2 g / l erfolgreich. Bei den hier vorgestellten Versuchen zur Mediumausnutzung konnten keine Beeinträchtigungen festgestellt werden, daraus kann geschlossen werden, dass auch das Lactat alleine keine negativen Einflüsse auf das *N-glycan pattern* und den Anteil an vollständig terminal sialylierten Strukturen hat.

Steigerung der Ausbeute durch Langzeitkultivierung im Perfusionsmodus

Die Produktion mit einem Perfusionsprozess wird mit Verlängerung der Kultivierungsdauer immer kostengünstiger gegenüber einem Batchprozess. In Kapitel 3.2.6 wurde die Langzeitkultivierung in Spinnerflaschen über mehr als 4 Monate beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen über den gesamten Kultivierungszeitraum konstant wachsen, produzieren und dass das Produkt eine konstant hohe Sialylierung und ein sich nicht veränderndes *glycan pattern* hinsichtlich der O- und der N-Glycosylierung aufweist. Damit sind die Zellen mit dem ausgewählten Medium grundsätzlich für Langzeitkultivierungen geeignet. Die Eignung für eine Langzeitkultivierung im Bioreaktor mit der Perfusions/Bleeding-Strategie wurde mit einer Zellzahl zwischen 1 und $2 \cdot 10^6$ Zellen / ml überprüft. Während der Kultivierung wurden mehrere Versuche durchgeführt. Die Kultivierung ist in Abbildung 3.26 auf Seite 116 gezeigt. Die Langzeitkultivierung bestand für 26 Produktionstage. Während der gesamten Produktionszeit waren die Verdopplungszeit und die Produktivität konstant ($\mu = 0,014 \text{ h}^{-1}$, ca. $81 \text{ mg} / (\text{Tag} \cdot 10^{10} \text{ Zellen})$). Tabelle 3.10 zeigt die Anteile der vollständig terminal sialylierten N-Glycane der Produktionstage, die nicht schon in Tabelle 3.9 auf Seite 119 gezeigt sind.

Tabelle 3.10: Anteil der vollständigen terminalen Sialylierung während der letzten acht Tage der Langzeitkultivierung in Bioreaktor und Ernte.

Kulturzeit [d]	vollständig sialyliert, Bioreaktor [%]	vollständig sialyliert, Ernte [%]
24	60	64
25	54	50
26	67	58
27	59	54
28	65	55

Die Langzeitkultivierung mit der Perfusions/Bleeding-Strategie ist für mindestens 26 Produktionstage möglich. Dabei sind die Wachstumsgeschwindigkeit, die Produktivität und das *glycan pattern* konstant. Der Anteil vollständig terminal sialylierter N-Glycane lag bis auf einen Tag über der geforderten Spezifikation von mindestens 40 %. Durch die Langzeitkultivierung im Perfusionsmodus ist eine Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute gegenüber dem Batchmodus möglich.

Steigerung der Ausbeute durch Kultivierung bei höherer Zellkonzentration

Der Vorteil von Perfusionskultivierungen liegt in der Möglichkeit, durch den ständigen Medien austausch, Kultivierungsbedingungen zu schaffen, welche die Kultivierung deutlich höherer Zellkonzentrationen zulassen als dies bei Batchkultivierungen der Fall ist. Durch die Kultivierung der GA-EPO Zellen mit der Perfusions/Bleeding-Strategie bei einer Konzentration von 5 bis $6 \cdot 10^6$ Zellen / ml soll die Raum/Zeit-Ausbeute des Prozesses noch weiter gesteigert werden. Der Kultivierungsverlauf ist in Abbildung 3.26 B auf Seite 116 dargestellt. Die GA-EPO Produktion betrug an den vier Produktionstagen durchschnittlich 425 mg / d. Die Produktivität lag demnach bei ca. 77 mg / ($d \cdot 10^{10}$ Zellen). Sie ist vergleichbar mit der Produktivität bei geringeren Zellzahlen und geringerer Medienausnutzung. Abbildung 3.28 zeigt die Chromatogramme der HPAEC PAD Analysen der nativen N-Glycane des GA-EPOs produziert bei erhöhter Zellkonzentration.

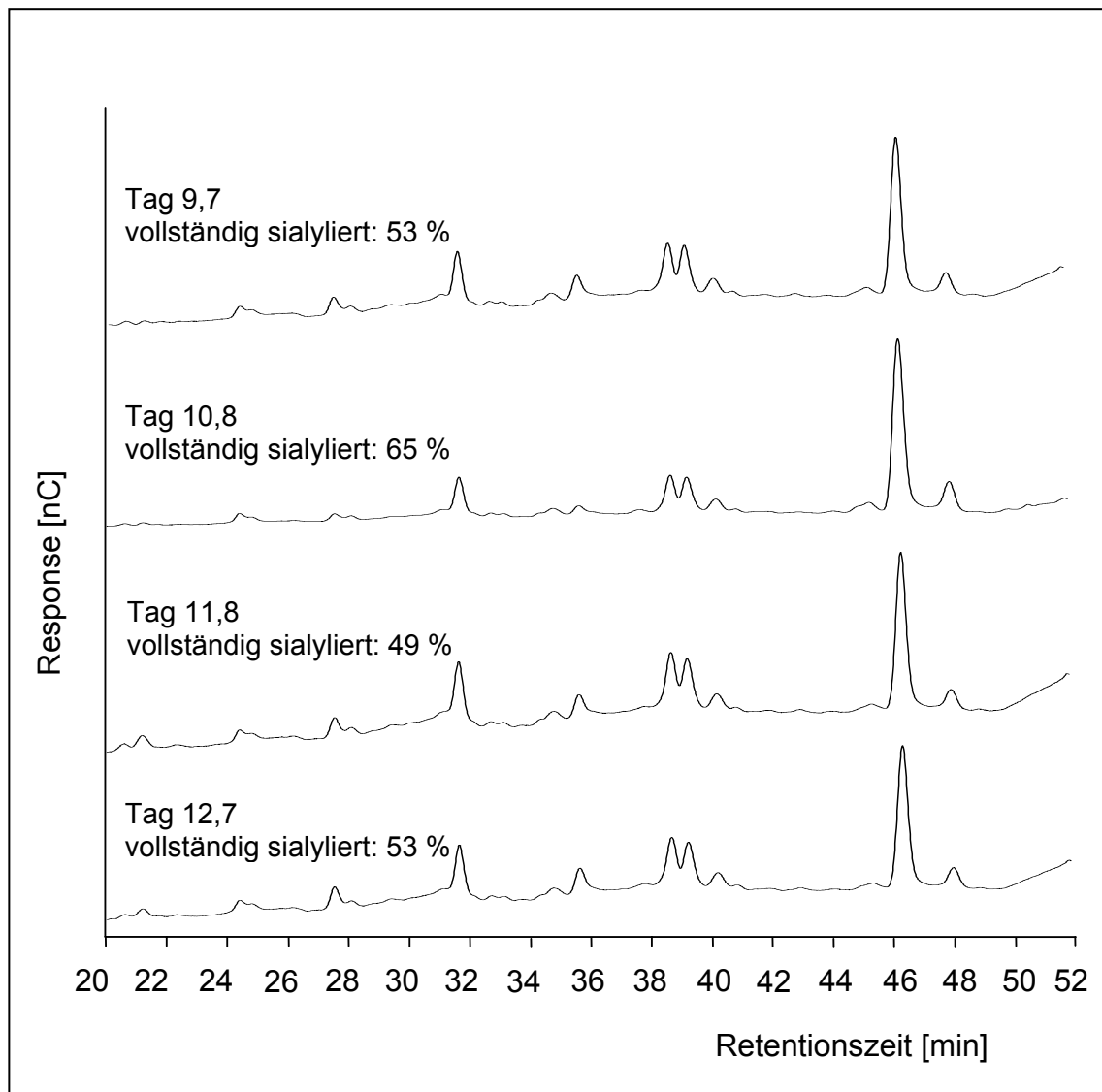


Abbildung 3.28: HPAEC PAD Analysen der nativen N-Glycane von GA-EPO aus einer Kultivierung mit der Perfusions/Bleeding-Strategie mit $5-6 \cdot 10^6$ Zellen / ml. Peak-Struktur Zuordnung: siehe Seiten 48 und 51.

Der Anteil an vollständig terminal sialylierten N-Glycanen entsprach sowohl im Bioreaktor als auch in der Ernte der Spezifikation (*vergl. Tabelle 3.9, Seite 119*). Das *glycan pattern* ist über den Kultivierungszeitraum vergleichbar mit allen vorherigen Kultivierungen mit diesem Medium. Bis auf die fehlenden N-Glycane mit dem Gal β 1-3GlcNAc Bindungsisomer zur meist vorkommenden Gal β 1-4GlcNAc Struktur sind die mit dieser Strategie produzierten N-Glycane des GA-EPOs vergleichbar mit denen aus dem Airlift-Prozess.

Die Kultivierung bei dieser erhöhten Zellzahl ergibt eine wesentlich höhere Produktausbeute, da die Produktivität der Zellen gleich geblieben ist. Da auch

der Anteil an vollständig terminal sialylierten N-Glycanen den Spezifikationen entspricht, sollte die Gesamtausbeute nach der Aufarbeitung deutlich höher liegen als zuvor. Die Erhöhung der Raum/Zeit-Ausbeute durch Erhöhung der Zellzahl war erfolgreich. Für einen Produktionsprozess wäre das Ziel, die Zellzahl auf eine Konzentration von $1 \cdot 10^7$ Zellen / ml zu erhöhen. Dazu müsste das Medium optimiert oder eine Steigerung der Perfusionsrate zur Versorgung der Zellen technisch über eine Vergrößerung der Austauschfläche realisiert werden.

3.3.3.5 Mikroheterogenität der O-Glycanstrukturen von GA-EPO aus dem Perfusionsprozess II

In Kapitel 3.1.2.2 wurde gezeigt, dass der Anteil an *core 2* O-Glycanstrukturen medienabhängig ist. Ob auch die Prozessführung Einfluss auf die O-Glycanstrukturen hat, soll hier anhand von SDS PAGE / Western Blot Analysen über eine Produktionsdauer von sechs Tagen untersucht werden (*die dazugehörigen Kultivierungsdaten sind in Abbildung 3.24 auf Seite 107 dargestellt*). Unterstützt werden die gelelektrophoretischen Untersuchungen durch MALDI/TOF MS Analysen der tryptischen Peptide am ersten und am letzten Tag der Kultivierung, um durch eine komplementäre Analysenmethode die Aussagen des Western Blottes zu verifizieren und festzustellen, ob sich die Mikroheterogenität der O-Glycosylierung im Verlauf des Prozesses ändert. Die Untersuchung der Mikroheterogenität der O-Glycosylierung ist zudem zur Feststellung der Vergleichbarkeit mit der der O-Glycosylierung des GA-EPOs aus dem Airlift-Prozess notwendig. Abbildung 3.29 zeigt die SDS PAGE Analyse mit anschließendem Western Blot.

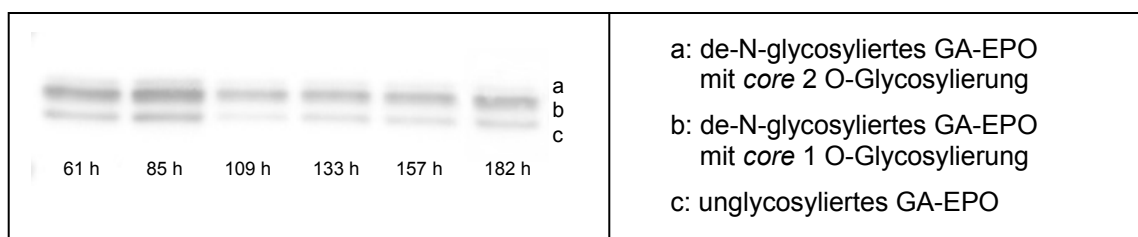


Abbildung 3.29: Untersuchungen der Varianten der O-Glycosylierung. SDS PAGE / Western Blot Analyse des de-N-glycosylierten GA-EPOs im Verlauf der Kultivierung mit der Perfusions/Bleeding-Strategie. Je Spur wurden ca. 50 ng Protein aufgetragen.

Die Heterogenität der O-Glycosylierung ändert sich im Verlauf der Kultivierung mit der Perfusions/Bleeding-Strategie nicht. In jeder Probe beträgt der Anteil der *core 2* O-Glycosylierung weniger als 10 %, ca. 60 % der Strukturen weisen eine *core 1* O-Glycosylierung auf, ca. 30 % sind nicht glycosyliert.

Für die MALDI/TOF MS Analysen wurde das GA-EPO tryptisch verdaut. Die entstandenen tryptischen Peptide sind in Abbildung 3.30 dargestellt.

1	APPR licdsr VLER ylleak EAENITTGCA	30
31	EHCSLNENITVPDTK vnfyawk R mevgqqa	60
61	vevwqglallseavlr GQALLVNSSQPWEP	90
91	LQLHVVDK avsglr SLTTLLR algaqk EAIS	120
121	PPDAASAAPLR titadtfr K lfr VYSNFLR	150
151	gk LK lytgeacr TGDR	166

Abbildung 3.30: Aminosäuresequenz von EPO. Die tryptischen Peptide sind jeweils in Groß- bzw. Kleinbuchstaben geschrieben. Das tryptische O-Glycopeptid ist gelb hinterlegt (AS 117-131), die Aminosäure Serin, an die das O-Glycan gebunden ist, ist fett gedruckt.

In Abbildung 3.31 sind die MALDI/TOF MS Analysen der tryptischen Peptide zu Beginn der Produktionsphase (A, *nach 61 h*) und am Ende der Produktionsphase (B, *nach 182 h*) dargestellt.

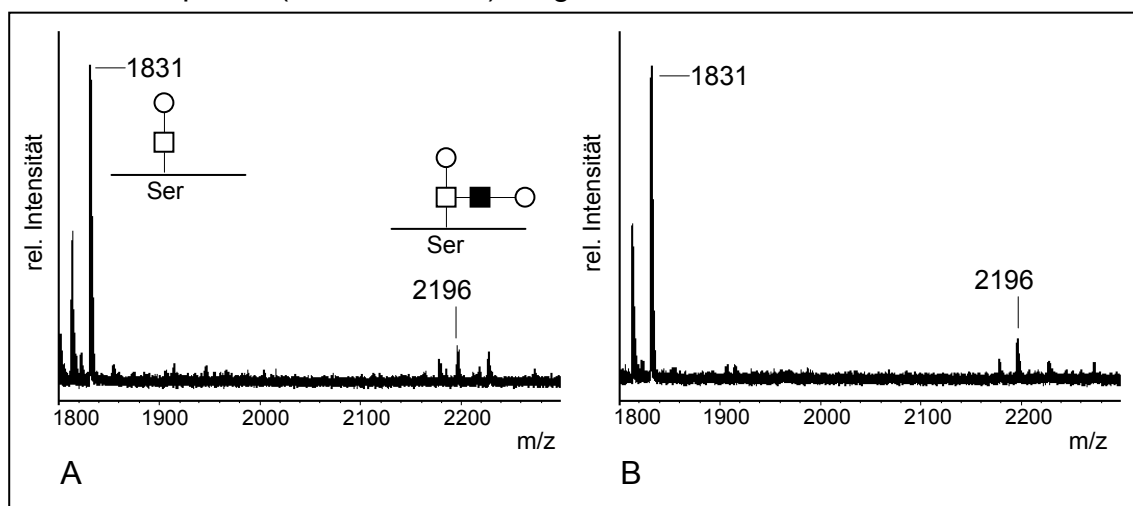


Abbildung 3.31: MALDI/TOF MS Analyse der tryptischen Glycopeptide von GA-EPO zur Überprüfung der O-Glycosylierungsvarianten. Es wurden Proben vom Beginn der Produktionsphase (A) und vom Ende der Produktionsphase (B) analysiert. Die detektierten Masse-Ladungsverhältnisse stimmen mit dem Molekulargewicht der folgenden Strukturen überein: m/z 1831: tryptisches Glycopeptid der Aminosäuren 117-131 mit einer *core 1* O-Glycosylierung, m/z 2196: tryptisches Glycopeptid der Aminosäuren 117-131 mit einer *core 2* O-Glycosylierung □ GalNAc, ○ Gal, ■ GlcNAc

Da die O-Glycanstrukturen von EPO sehr genau charakterisiert sind, können aus den verschiedenen Varianten die monoisotopischen Massen berechnet und mit den Signalen aus den MALDI/TOF MS Analysen verglichen werden. Werden diese Massen in den Spektren detektiert, so kann aus der Analyse auf die Glycanstrukturen geschlossen werden. Das Masse-Ladungsverhältnis m/z 1831 stimmt mit der Masse des tryptischen Glycopeptids der Aminosäuren 117-131 mit einer *core 1* O-Glycosylierung, das Masse-Ladungsverhältnis m/z 2196 mit der Masse des gleichen Glycopeptids mit einer *core 2* O-Glycosylierung überein. Die MALDI/TOF MS Analysen zeigen, dass sich der Anteil der *core 2* O-Glycanstrukturen während der Kultivierung nicht signifikant ändert.

Die Mikroheterogenität der O-Glycosylierung ändert sich durch die Kultivierung mit der Perfusions/Bleeding-Strategie sowie während des Verlaufs dieser Kultivierung nicht. Sie ist auch bei dieser Kultivierungsstrategie vergleichbar mit derjenigen des GA-EPOs produziert mit dem Airlift-Prozess. Daher ist dieser Prozess sehr gut geeignet, den Airlift-Prozess zur Produktion von GA-EOP zu ersetzen.

3.3.4 Vergleich der verschiedenen Produktionsprozesse

Zur Beurteilung der verschiedenen Prozesse zur Herstellung von GA-EPO in einem industriellen Prozess wird in diesem Kapitel eine Beispielberechnung der Raum/Zeit-Ausbeuten vorgestellt. Dabei werden aus den oben dargestellten Versuchen gewonnene Daten benutzt. Die angenommenen Volumina der Bioreaktoren entsprechen den häufig verwendeten Reaktorvolumina bei Firmen, die Auftragskultivierungen betreiben. Beim Perfusionsprozess II wurde eine Kultivierungsdauer von 40 Tagen angenommen und die Produktkonzentration nach diesem Zeitraum extrapoliert. Tabelle 3.11 zeigt den Vergleich der Raum/Zeitausbeute für die drei verschiedenen Kultivierungsstrategien.

Tabelle 3.11: Vergleich der Raum/Zeitausbeuten der Produktion von GA-EPO mit verschiedenen Kultivierungsstrategien

	Volumen des Bioreaktors [l]	Vorbereitungszeit [t]	Expansionszeit [t]	Produktionszeit [t]	Gesamtzeit [t]	Produktmeng [g/l] Reaktorvolumen	Produktmenge aus einem <i>batch</i> [g]	Gesamtausbeute nach 51 Tagen [g]	benötigte Zeit zur Produktion von 1 kg [t]
Batch	2000	4	11	5	20	0,03	60	153	340
<i>repeated Batch</i>	2000	4	11	5*2,5	27,5	0,1	200	371	138
Perfusion	250	2	9	40	51	1,7	425	425	123

Der Vergleich zwischen den Raum/Zeitausbeuten der verschiedenen Produktionsprozesse, die für die Herstellung von GA-EPO mit HT1080 Zellen benutzt werden könnten, zeigt, dass sich Batch und *repeated Batch* Prozess in der Produktmenge nach 51 Tagen um den Faktor 2,4 unterscheiden. Der Perfusionsprozess II ermöglicht die höchste Ausbeute, sie ist um den Faktor 2,7 höher als die des Batchprozesses. Reuveny et al. geben eine mögliche Ausbeutesteigerung von bis zu Faktor 5 für Perfusionsprozesse gegenüber Batchprozessen an (Reuveny et al. 1986). Ein solcher Faktor wäre auch für den hier vorgestellten Prozess denkbar, da die Optimierungsmöglichkeiten des Perfusionsprozesses II nicht ausgeschöpft wurden. Die Weiterentwicklung des Mediums zu einem Perfusionsmedium sollte eine Zellzahl im Bereich von $1 \cdot 10^7$ Zellen / ml zum Ziel haben. Die doppelte Zellzahl sollte auch zu einer Verdoppelung der Ausbeute führen. Aber auch der Batch- und der *repeated Batch*-Prozess haben weiteres Entwicklungspotential, wenn das Medium an diese Prozesse angepasst wird. Die Entscheidung für eine Prozessführungsstrategie für die Produktion hängt, bei gleicher Produktqualität, immer von den Rahmenbedingungen des Prozesses und der eventuell schon existierenden Anlagen ab. Allgemein gibt es in der Industrie wenige Prozesse, die kontinuierlich, meist als Perfusion, durchgeführt werden, da es kein ideales Perfusionsmodul gibt und die technischen Anforderungen hoch sind. Die meisten Firmen haben eine auf *fed batch* Kultivierung basierende Produktionsplattform aufgebaut, da der Anteil an empfindlichen therapeutischen

Proteinen, die die technisch anspruchsvolle Perfusionskultivierung rechtfertigen, am gesamten Kultivierungsaufkommen bisher gering ist (Voisard *et al.* 2003). Durch die ständige Ernte bei Perfusionsprozessen ist eine hohe Produktqualität von proteolytisch sensitiven Proteinen auch bei nicht erschöpfend entwickelten Prozessen gewährleistet. Daher eignet sich diese Prozessführungsstrategie besonders für die frühen Entwicklungsphasen eines Therapeutikums, um z. B. Material für die Präklinik und die klinische Phase I zu produzieren. Damit ist eine zügige Entwicklung gewährleistet und gleichzeitig die Möglichkeit geschaffen, die Prozessentwicklung mit verschiedenen Prozessführungsstrategien parallel zu den Prüfungen durchzuführen. Der hier vorgestellte Perfusionsprozess II eignet sich durch seine Stabilität für die Bereitstellung von Material für die Präklinik und klinische Phase I, über die endgültige Prozessführungsstrategie sollte entschieden werden, wenn die verschiedenen Prozesse weiter entwickelt wurden.

Im Vergleich zu anderen Produktionen von EPO für therapeutische Zwecke ist der mit dem hier vorgestellten Prozess erreichte Anteil an verwertbarem, vollständig terminal sialyliertem EPO sehr hoch. In einem Review-Artikel zeigen Grabenhorst *et al.* für die Herstellung von rhu EPO mit CHO oder BHK Zellen einen Anteil von 20-25 % an hochsialyliertem EPO auf (Gragenhorst *et al.* 1999 a; Grabenhorst *et al.* 1999 b). Für die hier entwickelten Prozesse wurde die gesetzte Spezifikation von mindestens 40 % vollständig terminal sialylierten N-Glycanen des GA-EPOs für alle Prozessführungsstrategien eingehalten und übertreffen damit die in der Literatur angegebenen Anteile signifikant.

3.3.4.1 Vergleich von Perfusionsprozess I und II

Bei der Kultivierung der HT1080 GA-EPO Zellen mit dem neu entwickelten Basalmedium CHO#6k (10 %) / DMEM F12 PDM 5.2 (90 %) sind im Gegensatz zu der Kultivierung mit dem Medium SMIF 7 morphologisch keine apoptotischen Zellen mehr sichtbar, eine *single cell* Suspension, konsistentes Wachstum und konsistente Produktion sowie ein sehr viel höherer Anteil an vollständig terminal sialylierten N-Glycanen des GA-EPOs im *bulk harvest* wurden erreicht. Somit sollte der Perfusionsprozess II im Gegensatz zum Perfusionsprozess I validierbar sein.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass im Vergleich mit dem Perfusionsprozess I, bei dem SMIF 7 als Produktionsmedium benutzt wurde, die Produktivität der Zellen mit dem hier vorgestellten Perfusionsprozess II mit CHO#6k (10 %) / DMEM F12 PDM 5.2 (90 %) erheblich höher war. Die HT1080 GA-EPO Zellen produzierten mit SMIF 7 ca. 5,8 mg / (Tag * 10¹⁰ Zellen) GA-EPO, während die Zellen mit dem Perfusionsprozess II eine Produktivität von ca. 79 mg / (Tag * 10¹⁰ Zellen) erreichen. Da zudem der Anteil an vollständig terminal sialylierten N-Glycanen im *bulk harvest* mit mindestens 40 % erheblich höher ist, wird die Gesamtausbeute des aufgereinigten EPOs durch beide Faktoren sehr viel höher ausfallen.

Zusammenfassung:

Es wurden drei verschiedene Produktionsprozesse für GA-EPO mit HT1080 GA-EPO Zellen, ein Batch, ein *repeated* Batch und ein Perfusionsprozess gezeigt. Für den Perfusionsprozess wurde eine Schnellmethode zur Präparation von N-Glycanen zur Überprüfung der qualitätsrelevanten Parameter entwickelt. Der Produktionsprozess mit einer Perfusions/Bleeding-Strategie konnte mit dieser Analytik überwacht und die täglichen Erntebatches zum *poolen* freigegeben werden. Zudem konnte die Robustheit des Prozesses hinsichtlich der Parameter Transmembrandruck, Medienausnutzung, Langzeitkultivierung und erhöhte Zellzahl gezeigt werden. Beim Vergleich der drei untersuchten Prozessführungsstrategien hat sich der Perfusionsprozess II als der geeignetste erwiesen, die Ausbeute nach 51 Tagen läge um den Faktor 2,7 höher als beim Batchprozess. Die Ausbeute des *repeated* Batch-Prozess hätte nach derselben Zeit bei etwa 87 % der Perfusionsausbeute gelegen. Alle Prozesse haben jedoch noch erhebliches Optimierungspotential. Der Anteil der vollständig terminal sialylierten N-Glycane betrug bei allen Prozessen immer mehr als 40 %, so dass die anfangs gesetzte Spezifikation erfüllt war und somit der Anteil des therapeutisch nutzbaren EPOs gegenüber den in der Literatur angegebenen Prozessen signifikant erhöht ist.

Die Produktivität des Perfusionsprozesses II war mit ca. 79 mg / (Tag * 10^{10} Zellen) erheblich höher als beim Perfusionsprozess I mit SMIF 7 mit 5,8 mg / (Tag * 10^{10} Zellen). Der viel höhere Anteil an vollständig terminal sialylierten N-Glycanen des EPOs im *bulk harvest* ermöglicht eine noch sehr viel höhere Gesamtausbeute nach der Aufarbeitung. Die bisherige Ausbeute von 25 % würde wahrscheinlich auf etwa 50 % steigen.

3.4 Glycosylation Engineering an der O-Glycosylierung

Im vorherigen Kapitel wurde ein Prozess für die Produktion von GA-EPO gezeigt, welches durch seinen hohen Anteil an vollständig terminal sialylierten Glycanen eine hohe *in vivo* Halbwertszeit gewährleisten sollte. Während der Prozessentwicklung wurden die Kultivierungsbedingungen der vorgegebenen HT1080 GA EPO Zellen optimiert. Eine weitere Möglichkeit, ein Produkt mit hoher *in vivo* Halbwertszeit herzustellen, besteht darin, das Glycosylierungspotential einer Zelllinie durch die Transfektion von chimären Glycosyltransferasen, d. h. durch direkten Eingriff in die Molekularbiologie der Zelle, zu verändern. Diese Zellen weisen vom Wildtyp abweichende Glycosylierungspotentiale auf. Als Folge davon exprimieren sie Glycoproteine, die eine von den Glycanen aus Wildtypzellen verschiedene Mikroheterogenität zeigen.

Für ein *proof of concept* des *glycosylation engineering* Ansatzes mit Hilfe von chimären Glycosyltransferasen (vergl. Kapitel 1.6) soll die O-Glycosylierung gezielt modifiziert werden, da sie durch ihre geringere Komplexität im Vergleich zur N-Glycosylierung schneller zu analysieren ist. Ziel dieses *glycosylation engineering* ist es, die Bildung einer *core 2* gegenüber einer *core 1* O-Glycanstruktur zu favorisieren. Da die sialylierte *core 1* Struktur kein Substrat für die *core 2*-GlcNAc-Transferase (C2GnT I) mehr darstellt, soll die katalytische Domäne dieser Transferase weiter vorne im Golgi lokalisiert werden und somit die Konkurrenzsituation zur Sialyltransferase zu Gunsten dieser Transferase verschoben werden. Dazu wurde die chimäre Glycosyltransferase *gnt 1*-C2GnT I, bestehend aus der CTS-Region der GnT I

Glycosyltransferase und der katalytischen Domäne der C2GnT I Glycosyltransferase, stabil transfiziert. Abbildung 3.32 zeigt die für diese Arbeit konstruierte chimäre Glycosyltransferase *gnt 1*-C2GnT I (A) sowie das hypothetische Targeting dieser Transferase durch das *glycosylation engineering* (B und C).

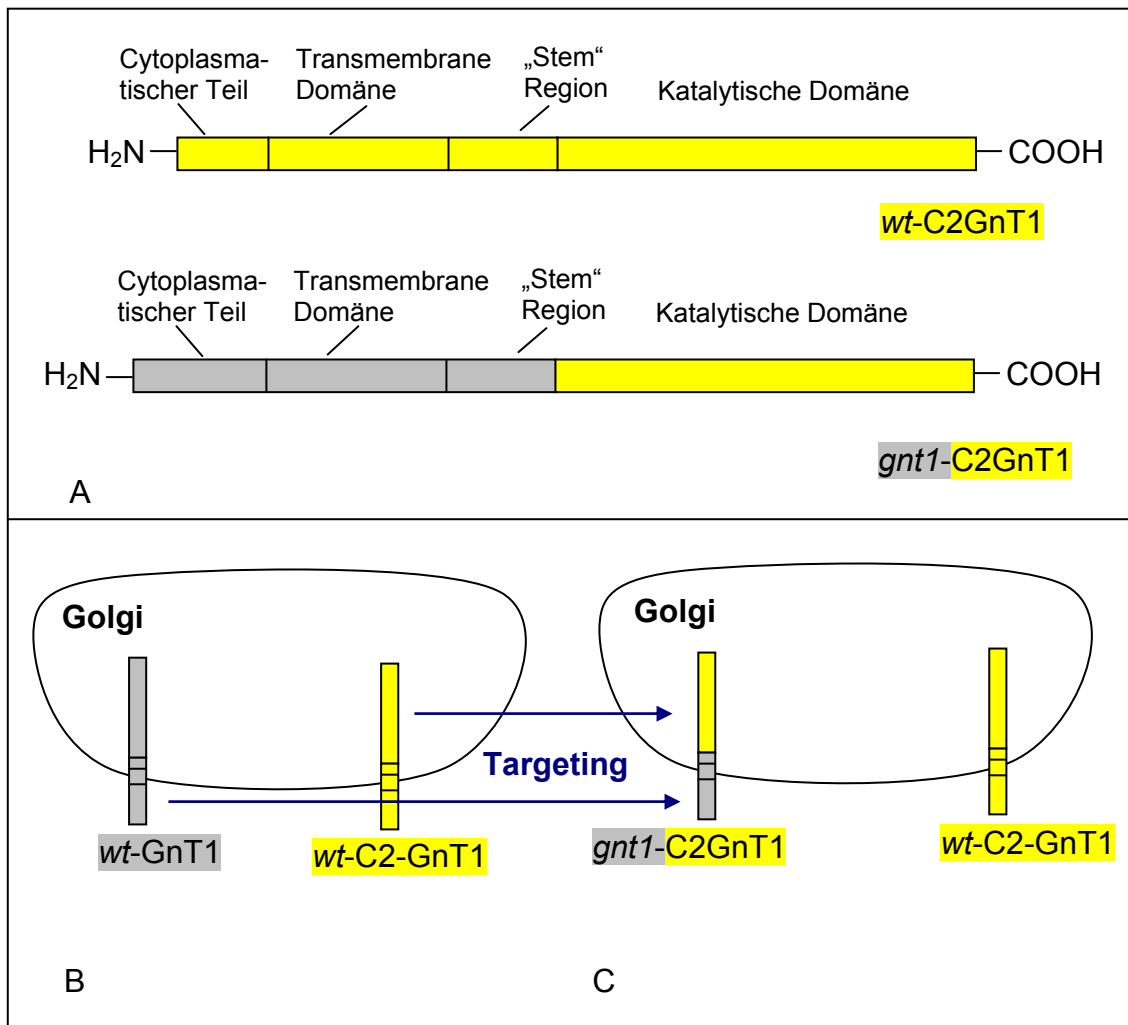


Abbildung 3.32: Schematische Darstellung des *glycosylation engineering* (A und B) sowie der Domänen der Glycosyltransferasen (C). Durch Austausch der CTS-Region entsteht eine chimäre Glycosyltransferase, die an einer anderen Stelle als die Wildtyp-Glycosyltransferase im Golgi lokalisiert wird.

Das *proof of concept* der oben beschriebenen *glycosylation engineering* Strategie soll an zwei verschiedenen Proteinen, IL2 und EPO, sowie mit zwei verschiedenen Zelllinien, BHK und HT1080, durchgeführt werden, um eine breitere Anwendbarkeit dieser Strategie zu zeigen.

Zunächst wurden BHK IL2 Zellen transfiziert, da die Transfektion dieser Zellen routinemäßig durchgeführt werden kann. IL2 verfügt über eine O-Glycosylierung am Thr 3 (Vita N. 1990), jedoch nicht über eine N-Glycosylierung. Dadurch kann der Erfolg des *glycosylation engineering*s durch eine einfache SDS PAGE / Western Blot Analyse überprüft werden, ohne dass zunächst N-Glycane abgespalten werden müssen. Abbildung 3.33 zeigt diese Analyse des IL2s aus dem Überstand von nicht transfizierten BHK IL2 Zellen sowie von BHK IL2 Zellen, die mit dem Vektor, der die vollständige codierende Sequenz der chimären Glycosyltransferase *gnt1-C2GnT I* trägt, transfiziert und anschließend subkloniert wurden.

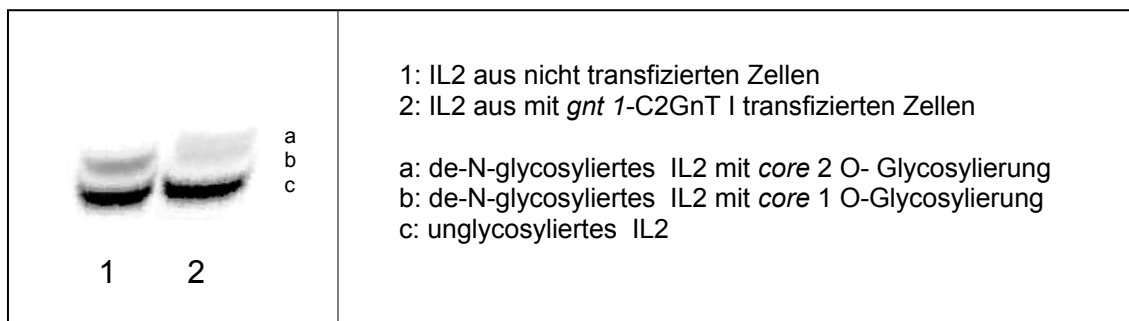


Abbildung 3.33: SDS PAGE / Western Blot Analyse des IL2s von nicht transfizierten und mit *gnt 1-C2GnT I* transfizierten BHK EPO Zellen. Je Spur wurde Zellkulturüberstand aufgetragen, der ca. 50 ng IL2 enthält.

Die O-Glycanstruktur des *wt*-IL2s aus der verwendeten Zelllinie wurde durch vorhergehende Versuche charakterisiert. Das IL2 der *wt*-BHK IL2 Zellen ist zu ca. 80 % nicht glycosyliert, ca. 20 % des Proteins weisen eine core 1 O-Glycanstruktur auf. Die mit *gnt 1-C2GnT I* transfizierten Zellen sezernierten ein IL2, das ebenfalls zu ca. 80 % nicht glycosyliert ist. Ca. 10 % des Proteins zeigen eine core 1 O-Glycanstruktur, das restliche Protein (10 %) weist ein Molekulargewicht auf, das auf eine komplexere Glycosylierung schließen lässt. Um nachzuweisen, dass es sich hierbei tatsächlich um die N-Acetyllaktosamininsertion (Kettenverlängerung um eine Acetyllaktosamineinheit) einer core 2 O-Glycanstruktur handelt, die durch die Transfektion erzeugt werden sollte, wurde wegen der durch die Hydrophobizität aufwändigen Reinigung von IL2 ein sequenzieller exoglycosidischer Abbau der O-Glycanstruktur vorgenommen, der Rückschlüsse auf die vorliegende

Oligosaccharidstruktur zulässt. Die SDS PAGE / Western Blot Analyse ist in Abbildung 3.34 dargestellt.

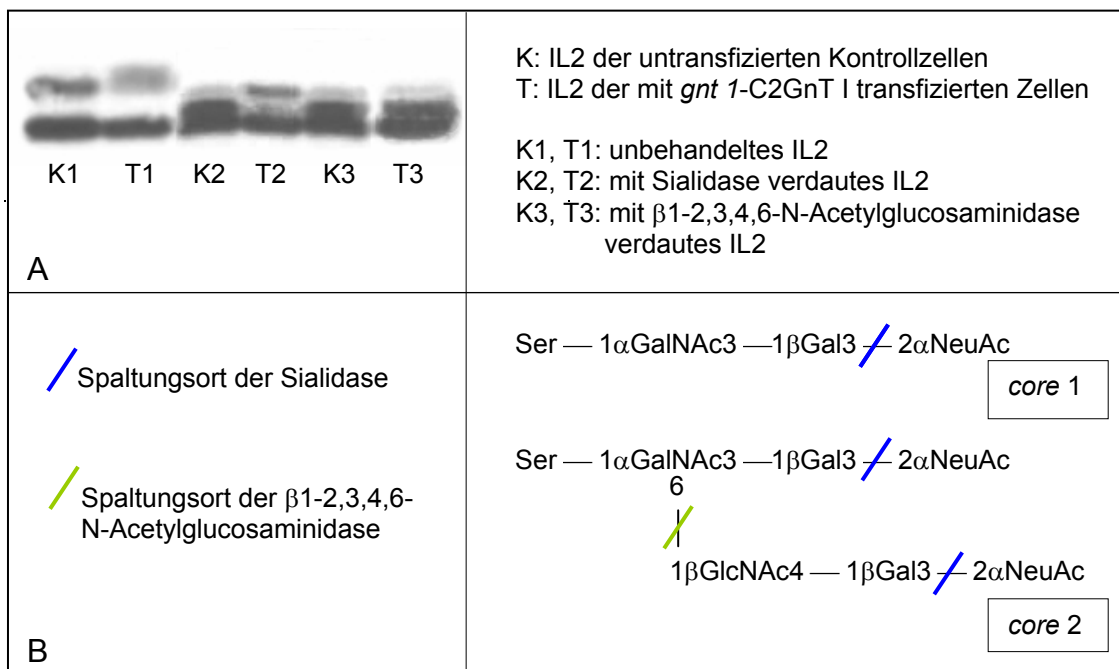


Abbildung 3.34: SDS PAGE / Western Blot Analyse des sequenziellen Enzymabbaus der O-Glycosylierung des IL2 produziert von untransfizierten (K) und mit *gnt 1*-C2GnT I transfizierten (T) BHK IL2 Zellen (A). Im unteren Teil der Abbildung (B) sind die core 1 und die core 2 Struktur sowie die Wirkungsstellen der Sialidase sowie der β 1-2,3,4,6-N-Acetylglucosaminidase schematisch dargestellt.

Die Spuren K1 und T1 zeigen jeweils das unbehandelte IL2. Das IL2, das von den untransfizierten Kontrollzellen (K) produziert wurde, trennt sich im Gel in Protein ohne O-Glycosylierung (*untere Bande*, ca. 60 %) und in Protein mit core 1 O-Glycanstruktur (*obere Bande*, ca. 40 %). Die mit *gnt 1*-C2GnT I transfizierten Zellen (T) produzierten IL2 ohne (*untere Bande*, ca. 80 %), mit core 1 (*mittlere Bande*, ca. 10 %) und wahrscheinlich core 2 (*obere Bande*, ca. 10 %) O-Glycanstruktur.

Das IL2 der Spuren K2 und T2 wurde vor dem Auftrag auf das Gel ü.N. mit Sialidase (Warren 1963) verdaut. Das unglycosylierte IL2 verändert die Position im Gel nicht, das apparente Molekulargewicht des IL2s mit core 1 O-Glycanstruktur sank aufgrund der fehlende Neuraminsäure (*mittlere Bande bei K2 und T2*). Ein Teil der core 1 Strukturen wurde nicht desialyliert. IL2 mit der nachzuweisenden core 2 O-Glycanstruktur zeigt nach der Desialylierung ein verringertes apparentes Molekulargewicht. Aufgrund der ungenügenden

Auflösung des Gels ergibt sich eine Bande mit nicht desialylierten *core 1* Strukturen. Wahrscheinlich befindet sich auch nicht vollständig desialyliertes IL2 mit der vermuteten *core 2* Struktur in dieser Bande.

Das IL2, das auch in den Spuren K3 und T3 aufgetragen wurde, wurde nach dem Sialidaseverdau noch mit β 1-2,3,4,6-N-Acetylglucosaminidase (Clarke *et al.* 1995) verdaut. Das unglycosylierte IL2 verändert die Position im Gel nicht, genauso wie das IL2 mit *core 1* O-Glycanstruktur. Daher bleiben die Banden des IL2s aus den untransfizierten Kontrollzellen (K3) im Vergleich zu vorher (K2) unverändert. Bei der vermuteten *core 2* O-Glycanstruktur verringerte sich durch den Verdau das Molekulargewicht, so dass das Protein vergleichbar zu einer *core 1* Struktur im Gel migriert und nur noch eine Bande im Gel zu sehen ist. Damit ist eine N-Acetyllactosamininsertion nachgewiesen.

Das *glycosylation engineering* zur Änderung der *core 1* O-Glycanstruktur in eine *core 2* O-Glycanstruktur von IL2 produziert mit BHK Zellen war demnach erfolgreich.

Im nächsten Schritt soll die Übertragbarkeit der *glycosylation engineering* Strategie auf ein anderes Protein überprüft werden. Dazu wurden ebenfalls wegen der guten Transfizierbarkeit BHK EPO Zellen benutzt. Für die Analyse des EPOs, das mit nicht transfizierten und mit *gnt 1-C2GnT I* stabil transfizierten BHK EPO Zellen produziert wurde, wurde das Protein mit N-Glycosydase F de-N-glycosyliert und anschließend auf ein SDS PAGE Gel aufgetragen und geblottet. Abbildung 3.35 zeigt die nativen und de-N-glycosylierten EPO-Proteine.

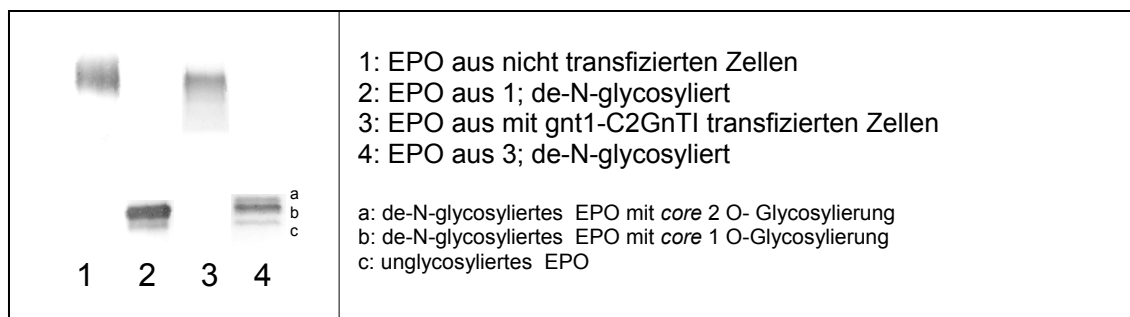


Abbildung 3.35: SDS PAGE / Western Blot Analyse von EPO aus untransfizierten und mit *gnt 1-C2GnT I* transfizierten BHK EPO Zellen. Je Spur wurden ca. 50 ng Protein aufgetragen.

EPO aus *wt*-BHK EPO Zellen wurde in der SDS PAGE / Western Blot Analyse nach de-N-Glycosylierung in zwei Banden aufgetrennt. Ca. 90 % des Proteins wandert in einer Bande (b), deren Mobilität einer *core* 1 O-Glycanstruktur entspricht, ca. 10 % des EPOs ist nicht O-glycosyliert (c). Das de-N-glycosylierte EPO aus stabil mit *gnt 1-C2GnT I* Plasmid transfizierten Zellen zeigt, im Gegensatz zu dem aus nicht transfizierten BHK EPO Zellen, eine zusätzliche Bande (a). Abgeleitet aus der Mobilität des Proteins handelt es sich dabei vermutlich um eine *core* 2 O-Glycanstruktur. Ca. 30 % der O-Glycane des EPOs bestehen aus dieser Struktur, ca. 60 % der O-Glycane weisen eine *core* 1 O-Glycanstruktur auf und ca. 10 % sind nicht glycosyliert.

Um diesen Befund zu unterstützen, wurde ein tryptischer Verdau mit nachfolgender MALDI/TOF MS Analyse der tryptischen Peptide durchgeführt. Die Sequenz der tryptischen Peptide ist in Abbildung 3.30 auf Seite 125 dargestellt. Abbildung 3.36 zeigt die Spektren der Wildtyp- und der transfizierten Zellen.

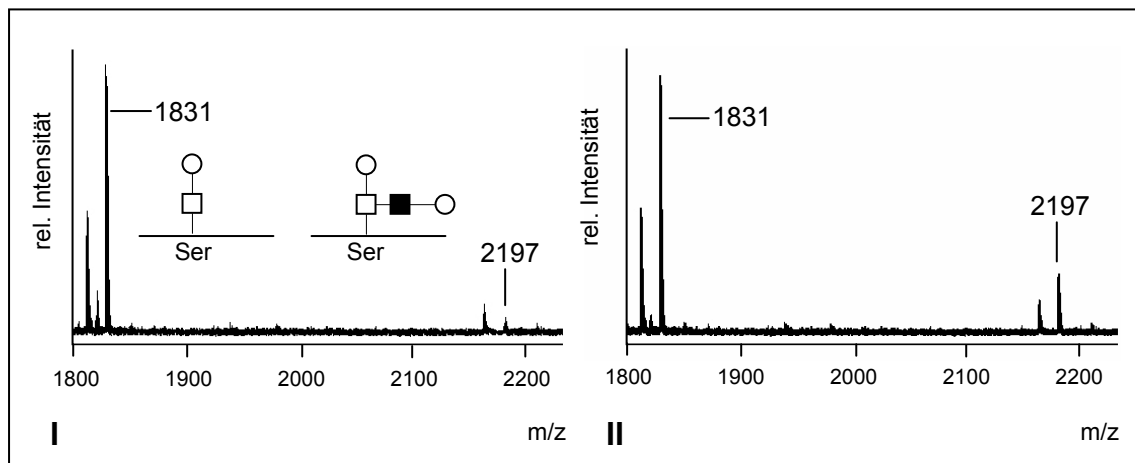


Abbildung 3.36: MALDI/TOF MS Analysen der tryptischen Glycopeptide von EPO nach *glycosylation engineering* von BHK EPO Zellen. Tryptische Glycopeptide von EPO aus I: nicht transfizierten BHK EPO Zellen, II: mit *gnt 1-C2GnT I* transfizierten BHK EPO Zellen. Die monoisotopische Masse 1831 Da entspricht der Masse des tryptischen Glycopeptids der Aminosäuren 117-131 mit einer *core* 1 O-Glycanstruktur, die monoisotopische Masse von 2197 Da entspricht der desselben tryptischen Peptids mit einer *core* 2 O-Glycanstruktur. □ GalNAc, ○ Gal, ■ GlcNAc

Die in den MALDI/TOF MS Analysen detektierte Masse von 1831 Da entspricht der Masse des tryptischen Glycopeptids der Aminosäuren 117-131 mit einer *core* 1 O-Glycanstruktur. Die Masse von 2197 Da entspricht der des tryptischen

Peptids mit einer *core 2* O-Glycanstruktur. Das Spektrum der MALDI/TOF MS Analysen der tryptischen EPO Peptide der nicht transfizierten BHK EPO Zellen (I) zeigt nur ein sehr kleineres Signal bei einer Masse von 2197 Da, das Spektrum der mit *gnt 1*-C2GnT I transfizierten BHK EPO Zellen (II) weist jedoch ein signifikantes Signal bei dieser Masse auf.

Die Ergebnisse der MALDI/TOF MS Analysen bestätigen die Ergebnisse aus der SDS PAGE / Western Blot Analyse. Das *glycosylation engineering* zur Einfügung einer *core 2* O-Glycanstruktur anstelle der *core 1* O-Glycanstruktur beim EPO produziert mit BHK Zellen war erfolgreich.

Das erfolgreiche *glycosylation engineering* zeigt die Wirksamkeit der Transfektion der chimären Glycosyltransferase bei BHK-Zellen sowohl für das Produkt IL2 als auch für das Produkt EPO.

Es soll gezeigt werden, dass die erfolgreiche Änderung des Glycosylierungspotentials, d. h. die Durchführung des *glycosylation engineering*s, auch bei HT1080 GA-EPO Zellen möglich ist. Die Zellen wurden mit der *wt*-C2GnT I und der *gnt 1*-C2GnT I Glycosyltransferase transfiziert. Die letztere sollte durch die *gnt 1* CTS Region ein früheres Retentionssignal für die Positionierung im Golgi aufweisen. Bei der Transfektion der *wt*-C2GnT I Glycosyltransferase handelt es sich um eine Überexpression dieser Transferase, die ebenfalls die Konkurrenzsituation zugunsten der *core 2* O-Glycanstruktur verschieben sollte. Für die Versuche wurden die Zellen mit dem Medium DMEM F12 PDM 5.2 (90 %) / CHO#6k (10 %) kultiviert.

Um die erfolgreiche Expression der Enzyme nachweisen zu können, wurde ein V5 Reporter-Epitop jeweils hinter die Glycosyltransferasen kloniert. Bei dem V5-Epitop handelt es sich um ein virales Protein, das im Wildtyp der Zellen nicht vorkommt und somit einen immunologischen Nachweis der Enzyme ermöglicht. Die Lysate der Zellen wurden auf ein SDS Gel aufgetragen, von dem anschließend ein Western Blot mit einem gegen das V5-Epitop gerichteten Antikörper durchgeführt wurde. Abbildung 3.37 zeigt die SDS PAGE / Western Blot Analyse.

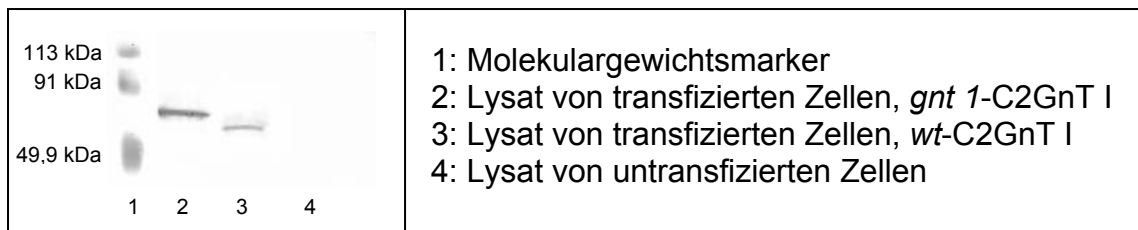


Abbildung 3.37: SDS Gelelektrophorese / Western Blot Analyse von Zelllysaten der mit *gnt 1-C2GnT1* (2) (ca. 65 kDa) bzw. *wt-C2GnT1* (3) (ca. 60 kDa) transfizierten bzw. untransfizierten (4) Zellen. Der für den Blot benutzte Antikörper richtete sich gegen das V5 Epitop, das hinter das jeweilige Enzym kloniert wurde. Je Spur wurde das Lysat von $1 \cdot 10^6$ Zellen aufgetragen.

Der gegen das V5 Epitop gerichtete Antikörper weist in den Zelllysaten der transfizierten Zellen im Gegensatz zu dem Lysat der nicht transfizierten Zellen Protein mit dem V5-Epitop nach. Mit zwei N-Glycosylierungsstellen in der katalytischen Domäne und dem angehängten V5-Epitop beträgt das berechnete Molekulargewicht des chimären Enzyms *gnt 1-C2GnT I* ca. 65 kDa. Im Lysat von Zellen, die mit diesem Enzym transfiziert wurden, konnte eine Bande bei passendem apparenten Molekulargewicht nachgewiesen werden (*Spur 2*). Das berechnete Molekulargewicht des Wildtyp-Enzyms, *wt-C2GnT I*, ebenfalls mit 2 N-Glycosylierungsstellen und dem V5-Epitop, beträgt ca. 60 kDa. Im Lysat der mit diesem Enzym transfizierten Zellen konnte beim entsprechenden apparenten Molekulargewicht eine Bande nachgewiesen werden (*Spur 3*). Die Voraussetzung für ein erfolgreiches *glycosylation engineering*, die Expression der Enzyme *gnt 1-C2GnT I* und *wt-C2GnT I* wurde somit durch eine immunologische Technik bestätigt.

Sind die nachgewiesenen Enzyme *in vivo* aktiv, sollte das Glycosylierungspotential der Zellen verändert und somit die O-Glycosylierung anders, d. h. mit einem höheren Anteil an *core 2* Strukturen modifiziert sein. Abbildung 3.38 zeigt die SDS PAGE / Western Blot Analyse des GA-EPOs aus den nicht transfizierten und transfizierten HT1080 GA-EPO Zellen.

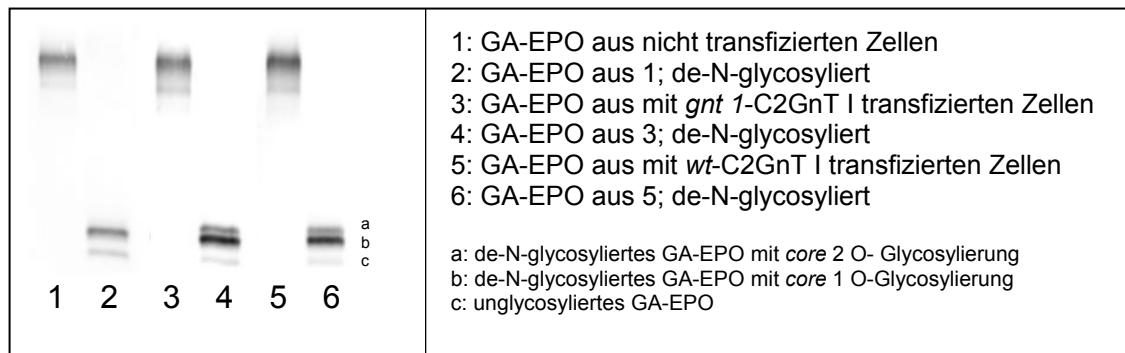


Abbildung 3.38: SDS PAGE / Western Blot Analyse von nicht transfizierten und mit *wt*-C2GnT1 bzw. *gnt1*-C2GnT1 transfizierten HT1080 GA-EPO Zellen. Je Spur wurde jeweils das Equivalent von 150 µl Zellkulturüberstand aufgetragen.

Das GA-EPO der untransfizierten Zellen (*Spur 2*) zeigt nach de-N-Glycosylierung ca. 10 % unglycosyliertes und ca. 90 % GA-EPO mit einer *core 1* O-Glycanstruktur. Das GA-EPO der mit *gnt 1*-C2GnT I transfizierten Zellen (*Spur 4*) weist zusätzlich zu den Banden des unglycosylierten (ca. 10 %) und des mit einer *core 1* O-Glycanstruktur versehenen GA-EPOs (ca. 60 %) eine Bande mit höherem apparentem Molekulargewicht auf, bei der es sich vermutlich um GA-EPO mit einer *core 2* O-Glycanstruktur (ca.30 %) handelt. Das GA-EPO aus *wt*-C2GnT I transfizierten Zellen zeigt ca. 10 % unglycosyliertes EPO, ca. 60 % mit einer *core 1* O-Glycanstruktur versehenes EPO und ca. 30 % einer EPO Form mit einem höheren apparenten Molekulargewicht, bei dem es sich vermutlich um EPO mit einer *core 2* O-Glycosylierung handelt.

Zur Bestätigung, dass es sich um eine *core 2* Struktur handelt, wurde analog zu den vorherigen Experimenten eine MALDI/TOF MS Analysen durchgeführt. Die erhaltenen Spektren der tryptischen Glycopeptide der mit *gnt 1*-C2GnT I und *wt*-C2GnT I sowie der untransfizierten Zellen sind in Abbildung 3.39 dargestellt.

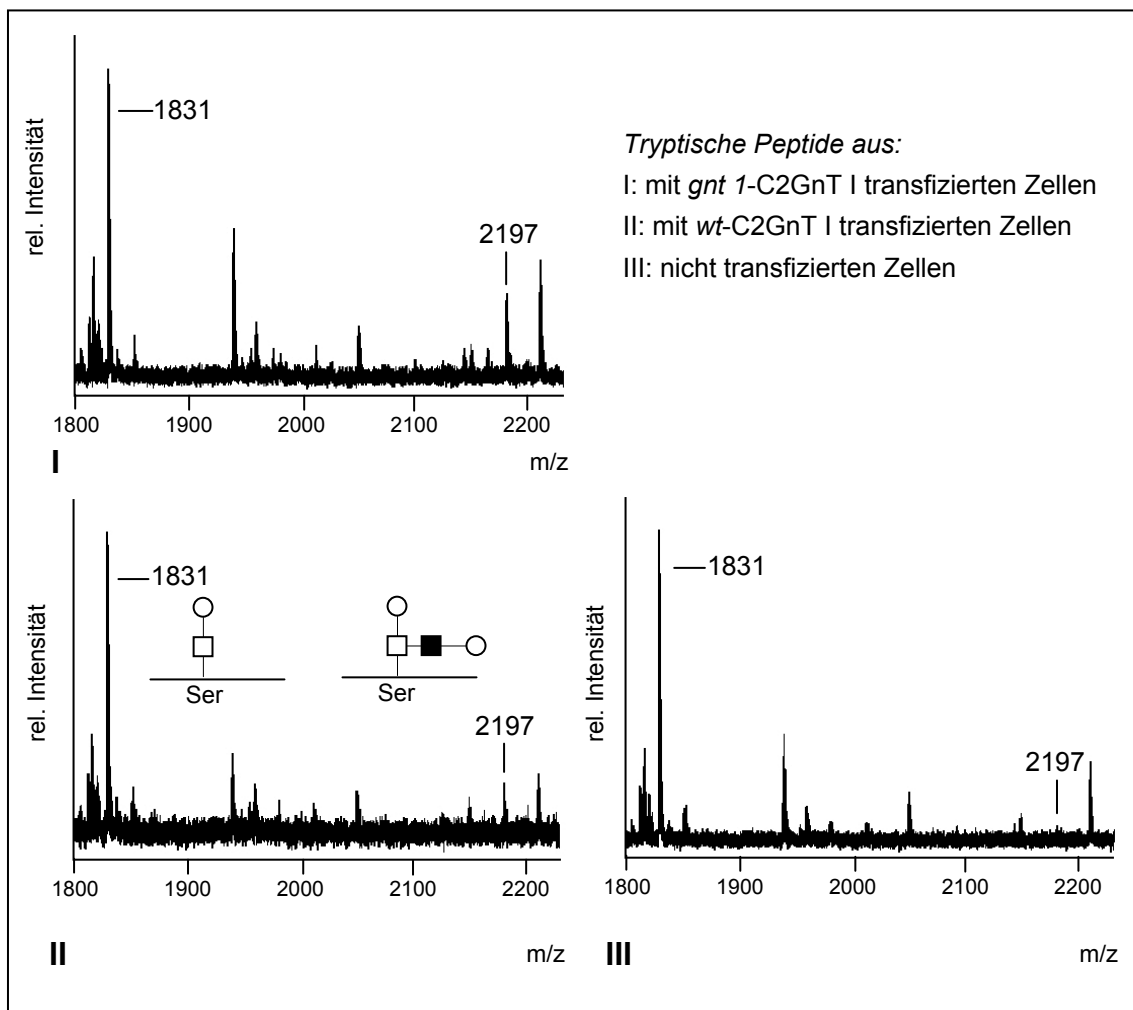


Abbildung 3.39: MALDI/TOF MS Analysen der tryptischen Glycopeptide von GA-EPO vor und nach dem *glycosylation engineering*. GA-EPO aus I: mit *gnt 1*-C2GnT I transfizierten HT1080 GA-EPO Zellen, II: mit *wt*-C2GnT I transfizierten HT1080 GA-EPO Zellen und III: nicht transfizierten HT1080 GA-EPO Zellen. Die monoisotopische Masse von 1831 Da entspricht der des tryptische Glycopeptid der Aminosäuren 117-131 mit einer *core 1* O-Glycanstruktur, die monoisotopische Masse von 2197 Da entspricht der des gleichen tryptischen Peptids mit einer *core 2* O-Glycanstruktur. Die O-Glycanstrukturen sind schematisch dargestellt.

□ GalNAc, ○ Gal, ■ GlcNAc

Das Signal m/z 1831 Da entspricht der Masse des tryptischen Glycopeptids der Aminosäuren 117-131 (*siehe Seite 125*) mit einer *core 1* O-Glycanstruktur, die monoisotopische Masse von 2197 Da entspricht der desselben Glycopeptids mit einer *core 2* O-Glycanstruktur.

Die detektierten Signalintensitäten bei der monoisotopischen Masse 2197 Da zeigen, dass das GA-EPO aus HT1080 Zellen, die mit *gnt 1*-C2GnT I (I) bzw. *wt*-C2GnT I (II) transfiziert wurden, einen signifikanten Anteil von

core 2 O-Glycanstrukturen enthalten. Im Falle des EPOs aus nicht transfizierten Zellen wurde kein entsprechendes Massensignal detektiert.

Das *glycosylation engineering* durch die Transfektion der chimären Glycosyltransferase *gnt 1-C2GnT I* führte somit erfolgreich zu einer Änderung des Glycosylierungspotentials der HT1080 GA-EPO Zellen. Der Anteil der *core 2* O-Glycanstrukturen des GA-EPOs ist gegenüber dem des Produktes aus nicht veränderten Zellen deutlich erhöht. Die Ergebnisse von Grabenhorst und Conradt, die zeigten, dass die CTS-Region von Glycosyltransferasen die Signale für das Verbleiben der Enzyme im Golgi und ihre Lokalisation beinhalten (Grabenhorst and Conradt 1999), konnten hier erfolgreich für das *glycosylation engineering* genutzt werden. Die reine Überexpression der *wt-C2GnT I* Glycosyltransferase führte ebenfalls zu einer Erhöhung des Anteils der *core 2* O-Glycanstruktur des GA-EPOs. Jedoch wird diese Strategie der Änderung des Glycosylpotentials einer Zelllinie problematisch bzw. undurchführbar sein, wenn diese Änderung mehrere Glycosyltransferasen betreffen soll.

Die oben dargestellten Versuchsergebnisse zeigen, dass das *glycosylation engineering* sowohl bei den verschiedenen Produkten EPO und IL2 sowie bei den verschiedenen Zelllinien BHK und HT1080 erfolgreich angewendet werden kann. Ein *glycosylation engineering* bei der humanen Fibrosarcomzelle HT1080 konnte somit erstmals gezeigt werden. Dabei konnte die aufgestellte Hypothese indirekt bestätigt werden, dass die Fusion der katalytischen Domäne der Glycosyltransferase C2GnT I mit der CTS-Region der GnT I Glycosyltransferase zu einer früheren Retention dieser Domäne im Golgi führt und somit die Bildung von *core 2* O-Glycanstrukturen verstärkt. Die GnT I Glycosyltransferase ist im medialen Golgi lokalisiert (Kornfeld and Kornfeld 1985). Durch das Ersetzen der Wildtyp-CTS-Region durch die der GnT I Glycosyltransferase sollte die *gnt 1-C2GnT I* Transferase ebenfalls im medialen Golgi lokalisiert werden. Dies sollte die Katalyse der Bindung eines GlcNAc in β 1-6 Stellung an das GalNAc der linearen Struktur gegenüber der Bindung einer Sialinsäure an die Gal der *core 1* Struktur bevorzugen, da die sialylierte *core 1* Struktur kein Akzeptorsubstrat für die C2GnT I Transferase mehr ist (Kuhns *et al.* 1993; Skrinicosky *et al.* 1997; Brockhausen 1999; Brockhausen *et*

al. 1998). Die alternativen Wege zur Bildung von *core 1* bzw. *core 2* Strukturen sind in Abbildung 3.40 schematisch dargestellt. Die transfizierte Glycosyltransferase wurde an den Wirkort eingetragen, an dem sie gemäß der Annahme und auch den Versuchsergebnissen lokalisiert sein sollte.

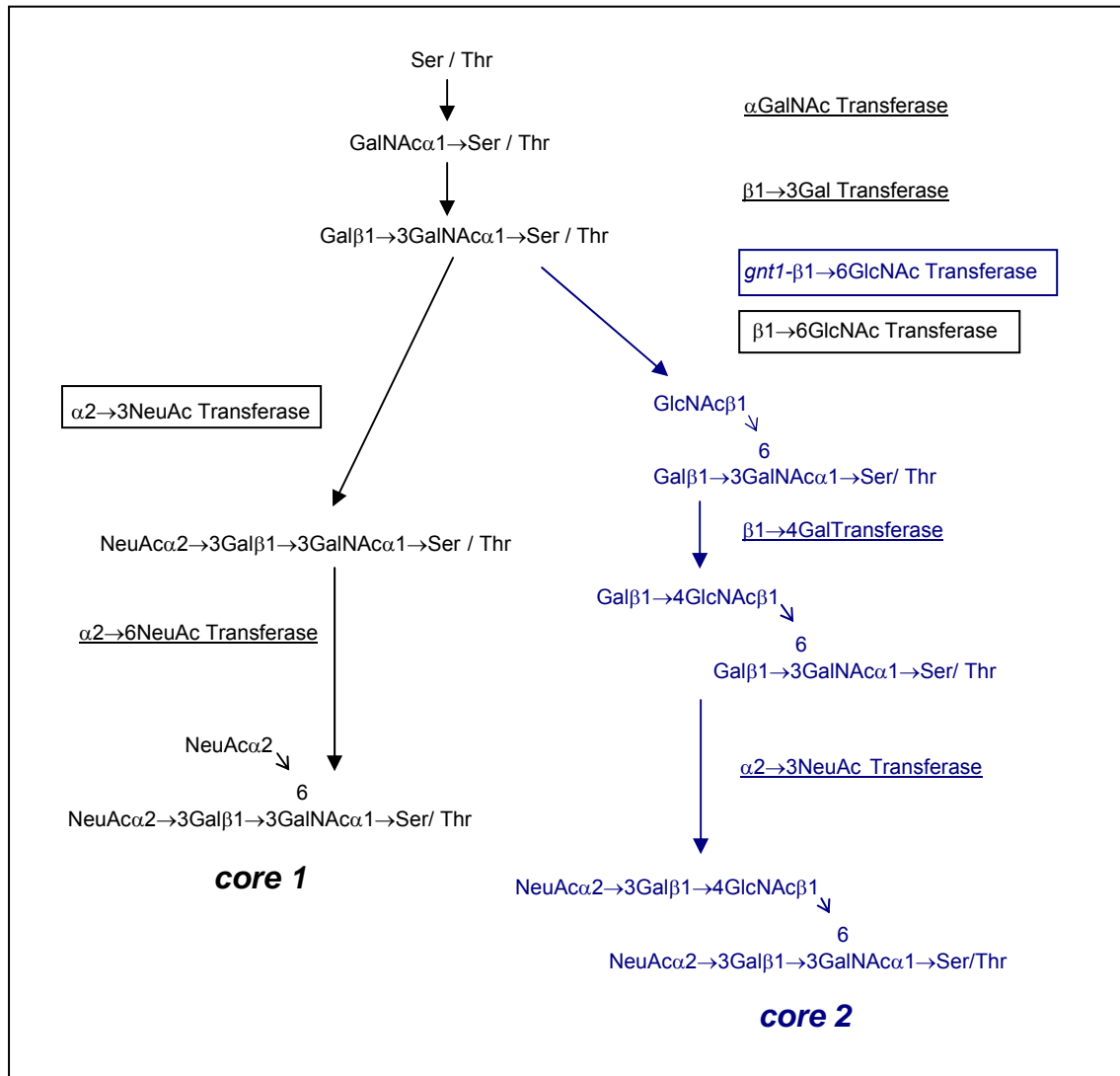


Abbildung 3.40: Schema der Konkurrenzsituation zwischen den Glycosyltransferasen, die die Katalyse einer *core 1* (α 2 \rightarrow 3NeuAc Transferase) bzw. einer *core 2* (β 1 \rightarrow 6GlcNAc Transferase, C2GnT I) O-Glycanstruktur bestimmen. Die transfizierte chimäre Glycosyltransferase (*gnt1*- β 1 \rightarrow 6GlcNAc Transferase, *gnt 1*-C2GnT I) ist durch ihre CTS Region wahrscheinlich noch vor der β 1 \rightarrow 6GlcNAc Transferase lokalisiert. Schema nach Skrincosky ergänzt (Skrincosky *et al.* 1997).

Die erfolgreiche Durchführung eines *glycosylation engineering*s mit verschiedenen Zelllinien an verschiedenen Produkten zeigt die Möglichkeit, mit dieser Technologie Zellen für die Produktion von Glycoproteinen mit vom

Wildtyp der Zelle abweichenden Glycosylierungspotentialen zu erzeugen und somit gezielt Glycoproteine der nächsten Generation zu produzieren.

3.4.1 Ausblick: *Glycosylation Engineering* zur Produktion eines EPOs der nächsten Generation

Als therapeutisches Protein wird ein EPO mit möglichst langer *in vivo* Halbwertszeit favorisiert, damit es Patienten möglichst selten verabreicht werden muss. Dies verringert sowohl die Kosten und dient dem Patienten, da dieser sich bei der Therapie mit dem herkömmlichen EPO zwei- bis dreimal wöchentlich in einer Klinik behandeln lassen muss (Egrie and Browne 2001).

Wie ausführlich in der Einleitung beschrieben, hängt die *in vivo* Halbwertszeit von EPO vor allem von der Sialylierung ab, jedoch scheint die Molekülgröße, die durch die Antennarität beeinflusst werden kann, aufgrund der glomerulären Filtration in der Niere ebenfalls ein wichtiger Faktor zu sein.

Eine Möglichkeit, die *in vivo* Halbwertszeit von EPO durch *glycosylation engineering* zu verändern, wäre die stabile Transfektion von Glycosyltransferasen, die die Bildung von pentaantennären N-Glycanen ermöglicht. Dadurch würde sich das Molekulargewicht des EPO Moleküls erhöhen, ebenso wie die gesamte negative Ladung, wenn die pentaantennären Strukturen vollständig terminal sialyliert werden. Folglich könnte die Geschwindigkeit oder das Maß der möglichen glomerulären Filtration herabgesetzt sein und somit ein EPO mit einer verlängerten *in vivo* Halbwertszeit zur Verfügung stehen. Ein Vergleich zwischen den häufig bei EPO vorliegenden Glycanstrukturen mit den potentiell durch *glycosylation engineering* erzeugbaren pentaantennären Strukturen ist in Abbildung 3.4.1 schematisch abgebildet.

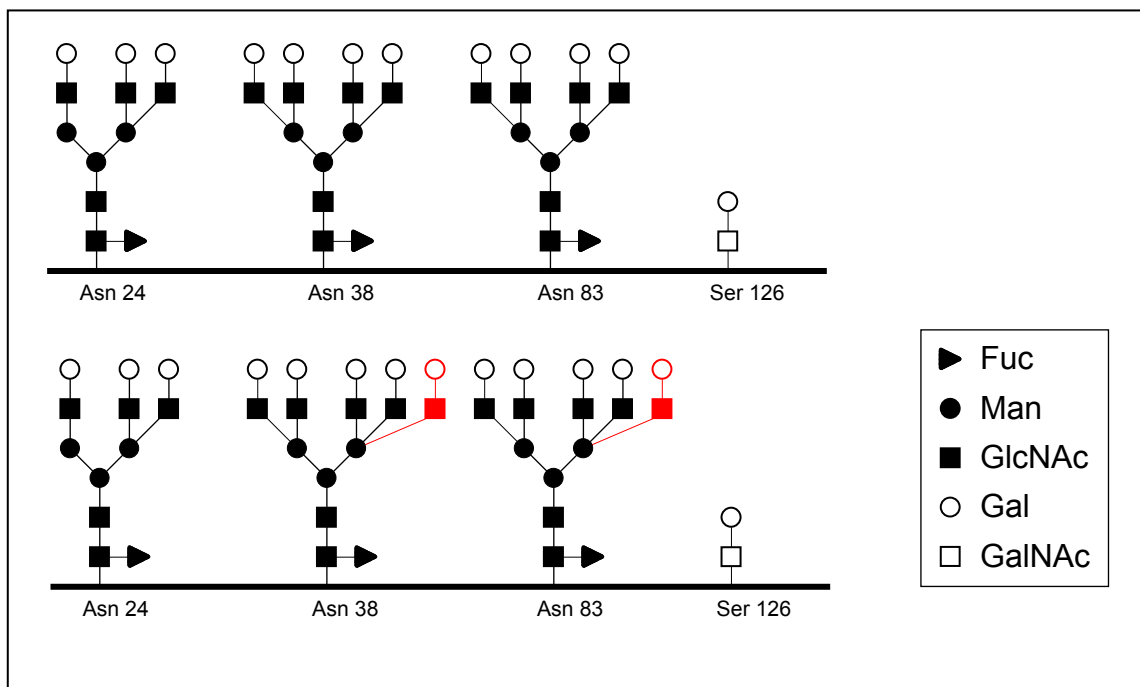


Abbildung 3.41: Schema von EPO Glycanstrukturen. Oben: häufige Glycanstrukturen von EPO, unten: mögliche Glycanstrukturen nach einem *glycosylation engineering*, das in die Biosynthese der N-Glycane eingreift.

Das obere Schema zeigt die statistischen Hauptformen der Glycanstrukturen des EPOs mit einem triantennären und zwei tetraantennären N-Glycanen sowie der klassischen *core 1* O-Glycanstruktur. Im unteren Schema sind die möglichen pentaantennären N-Glycanstrukturen nach einem *glycosylation engineering* abgebildet, das zu einem EPO der nächsten Generation führen soll.

Pentaantennäre N-Glycane sind bisher in mehreren Spezies, jedoch vor allem bei Hühnern gefunden worden (Brockhausen *et al.* 1989; Taguchi *et al.* 1997; Brockhausen *et al.* 1988a; Brockhausen *et al.* 1988b; Taguchi *et al.* 2000). Die Analyse von pentaantennären N-Glycanen von Transferrin aus der humanen hepatocarcinoma Zelllinie Hep G2 (Campion *et al.* 1989) belegt die Existenz einer solcher Struktur auch beim Menschen. Die pentaantennären Strukturen werden durch die *UDP-N-acetyl-D-glucosamin (GlcNAc): GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-2)-Man α 1-R[GlcNAc zu Man] β 1,4* N-Acetylglucos-aminyltransferase VI (GnT VI) katalysiert. Die DNA Sequenz ist bekannt, das Protein ist bereits gereinigt worden. Das Biosyntheseprodukt ist in Abbildung 3.42 blau hervorgehoben.

Molekulargewicht gegenüber dem *wt*-Protein und durch die höhere Anzahl an Sialinsäuren auch eine negativere Gesamtladung. Im Vergleich zum *wt*-EPO hat es die dreifache *in vivo* Halbwertszeit und braucht demzufolge den Patienten weniger häufig verabreicht zu werden (Egrie and Browne 2001). Die verlängerte *in vivo* Halbwertszeit könnte mit der oben schon diskutierten möglichen verlangsamen oder verringerten Glomerularfiltration in der Niere bei höherem Molekulargewicht durch die zusätzlichen Glycanstrukturen zusammenhängen. Durch die beiden zusätzlichen N-Glycane ist das Molekulargewicht von NESP beträchtlich höher als das eines hypothetischen EPOs mit überwiegend pentaantennären N-Glycanen. Ein Vorteil des EPOs mit z. B. pentaantennären N-Glycanen, die durch *glycosylation engineering* erzeugt wurden, liegt jedoch in der natürlich belassenen Polypeptidkette. Diese weist ein geringeres Risiko von potenziellen Immunreaktionen bei Langzeitpatienten auf, als es bei einer veränderten Primärsequenz der Fall ist.

Eine weitere Möglichkeit, ein Produkt mit gewünschten Glycanstrukturen zu erhalten, ist die GlycoAdvance Technologie der Firma Neose. Dabei werden die Glycanstrukturen von Proteinen mit Hilfe von Glycosyltransferasen *in vitro* verändert. Diese Technologie ist in der Entwicklung weniger umfangreich als das *glycosylation engineering*, die spätere Produktion jedoch deutlich aufwändiger.

Die Firma Glycart modifiziert Glycane durch die co-Expression von nativen Glycosyltransferasen. Diese Technologie hat jedoch im Vergleich zum *glycosylation engineering* ein geringeres Potential bei komplexen Veränderungen. Um Konkurrenzsituationen zwischen verschiedenen Glycosyltransferasen zu verschieben, müsste die gewünschte Glycosyltransferase überexprimiert werden. Müssten zusätzlich zur nativ gebildeten Glycanstruktur mehrere Glycosyltransferasen wirken, um zu einer Zielstruktur zu gelangen, wäre der Biosyntheseapparat durch die Überexpression so vieler Proteine wahrscheinlich überlastet.

Das in dieser Arbeit vorgestellte *glycosylation engineering* ermöglicht die Entwicklung von therapeutischen Glycoproteinen mit verbesserten Glycosylierungseigenschaften durch die zielgerichtete Lokalisation der Glycosyltransferasen in den Subkompartimenten des Golgis. Durch die in

dieser Arbeit aufgezeigten Vorarbeiten wäre es nun möglich, durch ein *glycosylation engineering* ein EPO einer neuen Generation herzustellen. Es konnte klar gezeigt werden, dass sich diese Technologie auf andere therapeutische Proteine übertragen lässt.

Zusammenfassung:

Durch das hier durchgeführte *glycosylation engineering*, bei dem BHK und HT1080 GA-EPO Zellen mit der chimären Glycosyltransferase *gnt 1-C2GnT I* transfiziert wurden, wurde das Glycosylierungspotential dieser Zellen gezielt verändert. Bei beiden getesteten Reporterproteine IL2 und EPO wurde durch diese Transfektion der Anteil der gebildeten *core 2* O-Glycanstrukturen gegenüber dem Anteil dieser Strukturen an Protein aus nicht transfizierten Zellen deutlich erhöht. Somit wurde eine Technologie entwickelt, mit der durch die gezielte Veränderung des Glycosylierungspotentials einer Zelllinie ein Glycoprotein mit vom Wildtyp abweichenden Glycanstrukturen produziert werden kann, das ein therapeutisches Protein der nächsten Generation darstellt. Eine mögliche Strategie für die Entwicklung eines EPOs der nächsten Generation, das durch überwiegend pentaantennäre N-Glycane eine gegenüber der natürlichen Variante erhöhte *in vivo* Halbwertszeit aufweisen sollte, wurde dargestellt.

4 Literaturverzeichnis

- Abeijon C, Hirschberg CB (1992) Topography of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci* **17**, 32-36
- Andersen DC, Goochee CF (1994) The effect of cell-culture conditions on the oligosaccharide structures of secreted glycoproteins. *Curr Opin Biotechnol* **5**, 546-549
- Ashwell G, Harford J (1982) Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu Rev Biochem* **51**, 531-554
- Ashwell G, Morell AG (1974) The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. *Adv Enzym* **41**, 99-128
- ATCC (2003) HT1080. ATCC Number: CRL-12011. www.atcc.org Zugriff: 1.12.2003
- Barnes D, Sato G (1980) Serum-free cell culture: a unifying approach. *Cell* **22**, 649-655
- Batistatou A, Greene LA (1991) Aurintricarboxylic acid rescues PC12 cells and sympathetic neurons from cell death caused by nerve growth factor deprivation: correlation with suppression of endonuclease activity. *J Cell Biol* **115**, 461-471
- Bause E (1983) Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. *Biochem J* **209**, 331-336
- Bernard BA, De Luca LM, Hassel JR, Yamada KM, Olden K (1984) Retenoic acid alters the proportion of high mannose to complex type of oligosaccharides on fibronectin secreted by cultured chondrocytes. *J Biol Chem* **259**, 5310-5315
- Borys MC, Linzer DI, Papoutsakis ET (1993) Culture pH affects expression rates and glycosylation of recombinant mouse placental lactogen proteins by Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Biotechnology (N.Y.)* **11**, 720-724
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254
- Brockhausen I (1999) Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer Cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1473**, 67-95
- Brockhausen I, Carver JP, Schachter H (1988a) Control of glycoprotein synthesis. The use of oligosaccharide substrates and HPLC to study the sequential pathway for N-acetylglucosaminyltransferase I, II, III, IV, V, and VI in the biosynthesis of highly branched N-glycans by hen oviduct membranes. *Biochem Cell Biol* **66**, 1134-1151

- Brockhausen I, Hull E, Hindsgaul O, Schachter H, Shah RN, Michnick SW, Carver JP (1989) Control of glycoprotein synthesis. Detection and characterization of a novel branching enzyme from hen oviduct, UDP-N-acetylglucosamine:GlcNAc beta 1-6 (GlcNAc beta 1-2)Man alpha-R (GlcNAc to Man) beta-4-N-acetylglucosaminyl-transferase VI. *J Biol Chem* **264**, 11211-11221
- Brockhausen I, Narasimhan S, Schachter, H (1988b) The biosynthesis of highly branched N-glycans: studies on the sequential pathway and functional role of N-acetylglucosaminyltransferases I, II, III, IV, V and VI. *Biochimie* **70**, 1521-1533
- Brockhausen I, Schutzbach J, Kuhns W (1998) Glycoproteins and Their Relationship to human Disease. *Acta Anatomica* **161**, 36-78
- Campion B, Leger D, Wieruszeski JM, Montreuil J, Spik G (1989) Presence of fucosylated triantennary, tetraantennary and pentaantennary glycans in transferrin synthesized by the human hepatocarcinoma cell line Hep G2. *Eur J Biochem* **184**, 405-413
- Chavarria T, Sanchez-Jimenez F, Quesada AR, Medina MA (2003) Homocysteine inhibits the proliferation and invasive potential of HT-1080 human fibrosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **301**, 540-544
- Clarke VA, Platt N, Butters TD (1995) Cloning and expression of the beta-N-acetylglucosaminidase gene from *Streptococcus pneumoniae*. Generation of truncated enzymes with modified aglycon specificity. *J Biol Chem* **270**, 8805-8814
- Colley KJ (1997) Golgi localization of glycosyltransferases: more questions than answers. *Glycobiology* **7**, 1-13
- Conradt HS (1990) Expression of Human Glycoproteins. In: *Recombinant Mammalian Cells: towards Genetic Engineering of N- and O-Glycoproteins*. Eds: Hofer B and Hauser H, TIGG **2[5]**, 168-181
- Conradt, HS, Grabenhorst, E, Nimtz, M (1996) Proteingebundene Oligosaccharide: Die Strukturvielfalt der natürlichen Glycoproteine erfordert die Konstruktion neuer Zellfabriken für die biotechnologische Herstellung verbesserter Human-Therapeutika *Wissenschaftlicher Ergebnisbericht, GBF*
- Conradt HS, Egge H, Peter-Katalinic J, Reiser W, Siklosi T, Schaper K (1987) Structure of the carbohydrate moiety of human interferon-beta secreted by a recombinant Chinese hamster ovary cell line. *J Biol Chem* **262**, 14600-14605
- Conradt HS, Geyer R, Hoppe J, Grotjahn L, Plessing A, Mohr H (1985) Structures of the major carbohydrates of natural human interleukin-2. *Eur J Biochem* **153**, 255-261
- Conradt HS, Nimtz M, Dittmar KEJ, Lindenmeyer W, Hoppe J, Hauser H (1989) Expression of human interleukin-2 in recombinant baby hamster kidney, Ltk⁻, and chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **264**, 17368-17373

- Cruz HJ, Freitas CM, Alves PM, Moreira JL, Carrondo MJ (2000) Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. *Enzyme Microb Technol* **27**, 43-52
- Cumming DA (1991a) Glycosylation of recombinant protein therapeutics: control and functional implications. *Glycobiology* **1**, 115-130
- Cumming DA (1991b) Structural heterogeneity and functional differentiation: a rationale for glycosylation analysis of recombinant therapeutics. *Semin Cell Biol* **2**, 273-279
- Cumming DA (1992) Physiological relevance of protein glycosylation. *Dev Biol Stand* **76**, 83-94
- Curling EM, Hayter PM, Baines AJ, Bull AT, Gull K, Strange PG, Jenkins N (1990) Recombinant human interferon-gamma. Differences in glycosylation and proteolytic processing lead to heterogeneity in batch culture. *Biochem J* **272**, 333-337
- Davidson SK, Hunt LA (1985) Sindbis virus glycoproteins are abnormally glycosylated in Chinese hamster ovary cells deprived of glucose. *J Gen Virol* **66**, 1457-1468
- de la Broise D, Noiseux M, Massie B, Lemieux R (1992) Hybridoma Perfusion Systems: A Comparison Study. *Biotechnol Bioeng* **40**, 25-32
- Delorme E, Lorenzini T, Giffin J, Martin F, Jacobsen F, Boone T, Elliott S (1992) Role of glycosylation on the secretion and biological activity of erythropoietin. *Biochemistry* **31**, 9871-9876
- Drickamer K (1991) Clearing up glycoprotein hormones. *Cell* **67**, (2) 1029-1032.
- Dwek RA, Edge CJ, Harvey DJ, Wormald MR, Parekh RB (1993) Analysis of glycoprotein-associated oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* **62**, 65-100
- Egrie J, Dwyer E, Lykos M, Hitz A, Browne JK (1997) Novel erythropoiesis stimulating protein (NESP) has a longer serum half-life and greater in vivo activity than recombinant human erythropoietin(rHuEPO). *Blood* **90**, 56
- Egrie JC, Browne JK (2001) Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *Nephrol Dial Transplant* **16** Suppl 3, 3-13.
- Elbein AD (1987) Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharide chains. *Annu Rev Biochem* **56**, 497-534
- Fiedler K, Simons K (1995) The role of N-glycans in the secretory pathway. *Cell* **81**, 309-312
- Fisher JW (1997) Erythropoietin: Physiologic and Pharmacologic Aspects. *P.S.E.B.M.* **216**, 358-369

- Fukuda MN, Sasaki H, Lopez L, Fukuda M (1989) Survival of recombinant erythropoietin in the circulation: the role of carbohydrates. *Blood* **73**, 84-89
- Galili U, Clark MR, Shohet SB, Buehler J, Macher BA (1987) Evolutionary relationship between the natural anti-Gal antibody and the Gal alpha 1----3Gal epitope in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 1369-1373
- Gawlitsek M, Valley U, Wagner R (1998) Ammonium ion and glucosamine dependent increases of oligosaccharide complexity in recombinant glycoproteins secreted from cultivated BHK-21 cells *Biotechnol Bioeng* **57**, 518-528
- Glacken MW, Adema E, Sinskey AJ (1988) Mathematical Descriptions of Hybridoma Culture Kinetics: I. Initial Metabolic rates. *Biotechnol Bioeng* **32**, 491-506
- Glacken MW (1998) Catabolic Control of Mammalian Cell Culture. *Bio/Technology* **6**, 1041-1050
- Goldwasser E, Kung CK, Eliason J (1974) On the mechanism of erythropoietin-induced differentiation. 13. The role of sialic acid in erythropoietin action. *J Biol Chem* **249**, 4202-4206
- Goochee CF, Gramer MJ, Andersen DC, Bahr JB, Rasmussen JR (1991) The oligosaccharides of glycoproteins: bioprocess factors affecting oligosaccharide structure and their effect on glycoprotein properties. *Biotechnology (N.Y.)* **9**, 1347-1355
- Goochee CF, Monica T (1990) Environmental effects on protein glycosylation. *Biotechnology (N.Y.)* **8**, 421-427
- Grabenhorst E, Hofer B, Nimtz M, Jager V, Conradt HS (1993) Biosynthesis and secretion of human interleukin 2 glycoprotein variants from baculovirus-infected Sf21 cells. Characterization of polypeptides and posttranslational modifications. *Eur J Biochem* **215**, 189-197
- Grabenhorst E, Schlenke P, Pohl S, Nimtz M, Conradt HS (1999 a) Genetic engineering of recombinant glycoproteins and the glycosylation pathway in mammalian host cells. *Glycoconj J* **16**, 81-97
- Grabenhorst E, Conradt HS (1999 b) The Cytoplasmic, Transmembrane, and Stem Regions of Glycosyltransferases Specify Their in Vivo Functional Sublocalization and Stability in the Golgi. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 36107-36116
- Gramer MJ, Goochee CF (1993) Glycosidase activities in Chinese hamster ovary cell lysate and cell culture supernatant. *Biotechnol Prog* **9**, 366-373
- Gramer MJ, Goochee CF, Chock VY, Brousseau DT, Sliwowski MB (1995) Removal of sialic acid from a glycoprotein in CHO cell culture supernatant by action of an extracellular CHO cell sialidase. *Biotechnology (N.Y.)* **13**, 692-698

Gutteridge JM, Quinlan GJ (1993) Antioxidant protection against organic and inorganic oxygen radicals by normal human plasma: the important primary role for iron-binding and iron-oxidising proteins. *Biochim Biophys Acta* **1156**, 144-150

Hardy MR, Townsend RR (1988) Separation of positional isomers of oligosaccharides and glycopeptides by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 3289-3293

Harris DC, Rinehart AL, Hereld D, Schwartz RW, Burke FP, Salvador AP (1985) Reduction potential of iron in transferrin. *Biochim Biophys Acta* **838**, 295-301

Hassell T, Gleave S, Butler M (1991) Growth inhibition in animal cell culture. The effect of lactate and ammonia. *Appl Biochem Biotechnol* **30**, 29-41

Hayter PM, Curling EM, Baines AJ, Jenkins N, Salmon I, Strange PG, Tong JM, Bull AT (1992) Glucose-Limited Chemostat of Chinese Hamster Ovary Cells Producing Recombinant Human Interferon gamma. *Biotechnol Bioeng* **39**, 327-335

Hermentin P, Witzel R, Kanzy EJ, Diderrich G, Hoffmann D, Metzner H, Vorlop J, Haupt H (1996) The hypothetical N-glycan charge: a number that characterizes protein glycosylation *Glycobiology* **6**, 217-230

Hirschberg CB, Snider MD (1987) Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus *Annu Rev Biochem* **56:63-87**, 63-87

Hokke CH, Bergwerff AA, Van Dedem GW, Kamerling JP, Vliegenthart JF (1995) Structural analysis of the sialylated N- and O-linked carbohydrate chains of recombinant human erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells. Sialylation patterns and branch location of dimeric N-acetylglucosamine units *Eur J Biochem* **228**, 981-1008

IMS World Review 2002 www.ims-global.com_Zugriff: 18.4.2003

Inoue Y, Lopez LB, Kawamoto S, Arita N, Teruya K, Seki K, Shoji M, Kamei M, Hashizume S, Shiozawa Y, Tachibana H, Ohashi H, Yasumoto K, Nagashima A, Nakahashi H, Suzuki T, Imai T, Nomoto K, Takenoyama M, Katakura Y, Shirahata S (1996) Production of recombinant human monoclonal antibody using ras-amplified BHK-21 cells in a protein-free medium *Biosci Biotechnol Biochem* **60**, 811-817

Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A, Sehra J, Jones SS, Hewick R, Fritsch HF, Kawakita M, Shimizu T, Miyake T (1985) Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* **313**, 806-810

Jenkins N, Curling EM (1994) Glycosylation of recombinant proteins: problems and prospects *Enzyme Microb Technol* **16**, 354-364

- Jenkins N, Parekh RB, James DC (1996) Getting the glycosylation right: implications for the biotechnology industry *Nat Biotechnol* **14**, 975-981
- Kanazawa K, Ashida K, Itoh M, Nagai H, Sasaki H, Fukuda M (1999) Establishment of a method for mapping of N-linked oligosaccharides and its use to analyze industrially produced recombinant erythropoietin *Biol Pharm Bull* **22**, 339-346
- Kaplan HA, Welply JK, Lennarz WJ (1987) Oligosaccharyl transferase: the central enzyme in the pathway of glycoprotein assembly *Biochim Biophys Acta* **906**, 161-173
- Keay L (1977) The growth of L-cells and Vero cells on an autoclavable MEM-peptone medium *Biotechnol Bioeng* **19**, 399-411
- Keenan J, Dooley M, Pearson D, Clynes M (1997) Recombinant Human Albumin in Cell Culture: Evaluation of Growth-Promoting Potential for NRK and SCC9Cells in vitro. *Cytotechnology* **24**, 243-252
- Kobata A (1992) Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins *Eur J Biochem* **209**, 483-501
- Kornfeld R, Kornfeld S (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides *Annu Rev Biochem* **54**, 631-664
- Koury MJ, Bondurant MC (1992) The molecular mechanism of erythropoietin action *Eur J Biochem* **210**, 649-663
- Krantz SB (1991) Erythropoietin *Blood* **77**, 419-434
- Kuhns W, Rutz V, Paulsen H, Matta KL, Baker MA, Barner M, Granovsky M, Brockhausen I (1993) Processing O-glycan core 1, Gal beta 1-3GalNAc alpha-R. Specificities of core 2, UDP-GlcNAc: Gal beta 1-3 GalNAc-R(GlcNAc to GalNAc) beta 6-N-acetylglucosaminyltransferase and CMP-sialic acid: Gal beta 1-3GalNAc-R alpha 3-sialyltransferase. *Glycoconj J* **10**, 381-394
- Kunkel JP, Jan DC, Jamieson JC, Butler M (1998) Dissolved oxygen concentration in serum-free continuous culture affects N-linked glycosylation of a monoclonal antibody. *J Biotechnol* **62**, 55-71
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- Lao MS, Toth D (1997) Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnol Prog* **13**, 688-691
- Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, Chen KK, Fox GM, Martin F, Stabinsky Z (1985) Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 7580-7584

Lindl T (2000) Zell- und Gewebekultur. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg 207

Litwin J (1989) The growth of hybridomas in a serum-free medium. Eds.: Spier RE, Griffiths JB, Stephenne J, Crooy PJ. In: *Advances in Animal Cell Biology and Technology for Bioprocesses*. Sevenoaks, Butterworths 273-276

Lotan R, Irimura T (1987) Enhanced glycosylation of a melanoma cell surface glycoprotein by retinoic acid: carbohydrate chain analysis by lectin binding. *Cancer Biochem Biophys* **9**, 211-221. 1987

Lotan R, Lotan D, Amos B (1988) Enhancement of sialyltransferase in two melanoma cell lines that are growth inhibited by retinoic acid results in increased sialylation of different cell-surface glycoproteins. *Exp Cell Res* **177**, 284-294

Lowy P, Keighley GN, Borsook HH (1960) Inactivation of erythropoietin by neuraminidase and by mild substitution reactions. *Nature* **185**, 102-103. 1960

Maack T (1975) Renal Handling of Low Molecular Weight Proteins. *Am J Med* **58**, 57-64

Maiorella B, Dorin G, Carion A, Harano D (1991) Crossflow microfiltration of animal cells. *Biotechnol Bioeng* **37**, 121-126.

McQueen A, Bailey JE (1991) Growth inhibition of hybridoma cells by ammonia ion: correlation with effects on intracellular pH. *Bioprocess Engineering* **6**, 49-61. 1991

Merten OW (2002) Development of serum-free media for cell growth and production of viruses/viral vaccines--safety issues of animal products used in serum-free media. *Dev Biol (Basel)* **111**, 233-257

Merten OW, Kallel H, Manuguerra JC, Tardy-Panit M, Crainic R, Delpeyroux F, Van der Werf S, Perrin P (1991) The new medium MDSS2N, free of any animal protein supports cell growth and production of various viruses. *Cytotechnology*, 30 (1-3) 191-201

Misaizu T, Matsuki S, Strickland TW, Takeuchi M, Kobata A, Takasaki S (1995) Role of antennary structure of N-linked sugar chains in renal handling of recombinant human erythropoietin. *Blood* **86**, 4097-4104

Molowa DT, Mazanet R (2003) The state of biopharmaceutical manufacturing. *Biotechnol Annu Rev* **9**, 285-302

Murakami H, Masui H, Sato GH, Sueoka N, Chow TP, Kano-Sueoka T (1982) Growth of hybridoma cells in serum-free medium: ethanolamine is an essential component *Proc Natl Acad Sci USA* **79**, 1158-1162

- Nabi IR, Dennis JW (1998) The extend of polylactosamine glycosylation of MDCK LAMP-2 is determined by its Golgi residence time. *Glycobiology* **8**, 947-953
- Nimtz M, Martin W, Wray V, Kloppel KD, Augustin J, Conradt HS (1993) Structures of sialylated oligosaccharides of human erythropoietin expressed in recombinant BHK 21 cells. *European Journal of Biochemistry* **213**, 39-56
- Nyberg GB, Balcarcel RR, Follstad BD, Stephanopoulos G, Wang DI (1999) Metabolic effects on recombinant interferon-gamma glycosylation in continuous culture of chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng* **62**, 336-347
- Packer NH, Lawson MA, Jardine DR, Sanchez JC, Gooley AA (1998) Analyzing glycoproteins separated by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* **19**, 981-988
- Patel TP, Parekh RB, Moellering BJ, Prior CP (1992) Different culture methods lead to differences in glycosylation of a murine IgG monoclonal antibody. *Biochem J* **285**, 839-845.
- Paulson JC, Colley KJ (1989) Glycosyltransferases: Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 17615-17618
- Pavlou, AK (2003) Marketspace: trends in biotherapeutics. *J Commer Biotechnol* **9**, 358-363
- Rademacher TW, Parekh R, Dwek RA (1988) Glycobiology. *Ann Rev Biochem* **57**, 785-838
- Rasheed S, Nelson-Rees WA, Toth EM, Arnstein P, Gardner MB (1974) Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer* **33**, 1027-1033
- Rasmussen L, Toftlund H (1986) Phosphate compounds as iron chelators in animal cell cultures. *In Vitro Cell Dev Biol* **22**, 177-179
- Rearick JI, Chapman A, Kornfeld S (1981) Glucose starvation alters lipid-linked oligosaccharide biosynthesis in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **256**, 6255-6261
- Restelli V, Butler M (2002) The effect of cell culture parameters on protein glycosylation. Ed.: M Al-Rubeai. In: *Glycosylation*. Kluwer, Dodrecht, **3**, 61-92
- Reuveny S, Velez D, Miller L, Macmillan JD (1986) Comparison of cell propagation methods for their effect on monoclonal antibody yield in fermentors. *Journal of Immunological Methods* **86**, 61-69
- Roth J, Wang Y, Eckhardt AE, Hill RL (1994) Subcellular localization of the UDP-N-acetyl-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-mediated O-glycosylation reaction in the submaxillary gland. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 8935-8939

Rothman RJ, Warren L, Vliegenthart JF, Hard KJ (1989) Clonal analysis of the glycosylation of immunoglobulin G secreted by murine hybridomas. *Biochemistry* **28**, 1377-1384

Rudd PM, Dwek RA (1997) Glycosylation: heterogeneity and the 3D structure of proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **32**, 1-100

Sadler JE (1984) Biosynthesis of Glycoproteins: Formation of O-linked Oligosaccharides. Eds.: Ginsburg V, Robbins PW. In: *Biology of Carbohydrates*. John Wiley & Sons, New York **2**, 4

Sakamoto Y, Taguchi T, Honke K, Korekane H, Watanabe H, Tano Y, Dohmae N, Takio K, Horii A, Taniguchi N (2000) Molecular cloning and expression of cDNA encoding chicken UDP-N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc): GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-2)- man α 1-R[GlcNAc to man] β 1,4N-acetylglucosaminyltransferase VI. *J Biol Chem* **275**, 36029-36034

Sarkar B (1970) State of iron(3) in normal human serum: low molecular weight and protein ligands besides transferrin. *Can J Biochem* **48**, 1339-1350

Sasaki H, Bothner B, Dell A, Fukuda M (1987) Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA. *J Biol Chem* **262**, 12059-12076

Sasaki H, Ochi N, Dell A, Fukuda M (1988) Site-specific glycosylation of human recombinant erythropoietin: analysis of glycopeptides or peptides at each glycosylation site by fast atom bombardment mass spectrometry. *Biochemistry* **27**, 8618-8626

Schachter H, Brockhausen I (1989) The Biosynthesis of Branched O-Glycans. Eds.: Chantler E, Ratcliffe NA. In: *Mucus and related Topics*. Symposia of the Society for Experimental Biology: Number XLIII, 1-26

Skrincosky D, Kain R, El Battari A, Exner M, Kerjaschki D, Fukuda M (1997) Altered Golgi localization of core 2 β -1,6-N-acetylglucosaminyltransferase leads to decreased synthesis of branched O-glycans. *J Biol Chem* **272**, 22695-22702

Spivak JL, Hogans BB (1989) The in vivo metabolism of recombinant human erythropoietin in the rat. *Blood* **73**, 90-99

Taguchi T, Kitajima K, Inoue S, Inoue Y, Yang JM, Schachter H, Brockhausen I (1997) Activity of UDP-GlcNAc:GlcNAc β 1 \rightarrow 6(GlcNAc β 1 \rightarrow 2) Man α 1 \rightarrow R[GlcNAc to Man] β 1 \rightarrow 4N-acetylglucosaminyltransferase VI (GnT VI) from the ovaries of *Oryzias latipes* (Medaka fish). *Biochem Biophys Res Commun* **230**, 533-536

Taguchi, T, Ogawa, T, Inoue, S, Inoue, Y, Sakamoto, Y, Korekane, H, Taniguchi, N (2000) Purification and Characterization of UDP-GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-2)Man α 1-R[GlcNAc to Man]- β 1,4-N-acetylglucosaminyltransferase VI from Hen Oviduct. *J Biol Chem* **275**, 32598-32602

Takeuchi M, Inoue N, Strickland TW, Kubota M, Wada M, Shimizu R, Hoshi S, Kozutsumi H, Takasaki S, Kobata A (1989) Relationship between sugar chain structure and biological activity of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 7819-7822

Takeuchi M, Kobata A (1991) Structures and functional roles of the sugar chains of human erythropoietins. *Glycobiology* **1**, 337-346

Takeuchi M, Takasaki S, Miyazaki H, Kato T, Hoshi S, Kochibe N, Kobata A (1988) Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human erythropoietins purified from urine and the culture medium of recombinant Chinese hamster ovary cells. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 3657-3663

Townsend RR, Hardy MR, Cumming DA, Carver JP, Bendiak B (1989) Separation of branched sialylated Oligosaccharides using high pH anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Anal Biochem* **182**, 1-8

Tsao EI, Bohn MA, Omstead DR, Munster MJ (1992) Optimization of a roller bottle process for the production of recombinant erythropoietin. *Ann NY Acad Sci* **665**, 127-136

Tsuda E, Goto M, Murakami A, Akai K, Ueda M, Kawanishi G, Takahashi N, Sasaki R, Chiba H, Ishihara H, (1988) Comparative structural study of N-linked oligosaccharides of urinary and recombinant erythropoietins. *Biochemistry* **27**, 5646-5654

Tsuda E, Kawanishi G, Ueda M, Masuda S, Sasaki R (1990) The role of carbohydrate in recombinant human erythropoietin. *Eur J Biochem* **188**, 405-411

Usuki S, Lyu SC, Sweeley CC (1988) Sialidase activities of cultured human fibroblasts and the metabolism of GM3 ganglioside. *J Biol Chem* **263**, 6847-6853

Van den Steen P., Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G (1998) Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **33**, 151-208

Varki A (1993) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **3**, 97-130

Vita N, Magazin M, Marchese E, Lupker J, Ferrara P (1990) Closely related glycosylation patterns of recombinant human IL-2 expressed in a CHO cell line and natural IL-2. *Lymphokine Res* **9**, 67-79

Voisard D, Meuwly F, Ruffieux PA, Baer G, Kadouri A (2003) Potential of cell retention techniques for large-scale high-density perfusion culture of suspended mammalian cells. *Biotechnol Bioeng* **82**, 751-765

Walsh G (2000) Biopharmaceutical benchmarks. *Nat Biotechnol* **18**, 831-833

- Walsh G (2003) Biopharmaceutical benchmarks-2003. *Nat Biotechnol* **21**, 865-870
- Warren L (1963) Thiobarbituric Acid Assay of Sialic Acids. *Methods Enzymol* **6**, 463-465
- Watson E, Bhide A, Van Halbeek H (1994) Structure determination of the intact major sialylated oligosaccharide chains of recombinant human erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells. *Glycobiology* **4**, 227-237
- Watson E, Shah B, Leiderman L, Hsu YR, Karkare S, Lu HS, Lin FK (1994) Comparison of N-linked oligosaccharides of recombinant human tissue kallikrein produced by Chinese hamster ovary cells on microcarrier beads and in serum-free suspension culture. *Biotechnol Prog* **10**, 39-44
- Weis W, Brown JH, Cusack S, Paulson JC, Skehel JJ, Wiley DC (1988) Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* **333**, 426-431
- Wolf G (1984) Multiple functions of vitamin A. *Physiol Rev.* **64**, 873-937
- Woodside SM, Brown BD, Piret JM (1998) Mammalian cell retention devices for stirred perfusion bioreactors. *Cytotechnology* **28**, 163-175
- Yamaguchi K, Akai K, Kawanishi G, Ueda M, Masuda S, Sasaki R (1991) Effects of site-directed removal of N-glycosylation sites in human erythropoietin on its production and biological properties. *J Biol Chem* **266**, 20434-20439
- Yang M, Butler M (2000) Effect of ammonia on the glycosylation of human recombinant erythropoietin in culture. *Biotechnol Prog* **16**, 751-759
- Zanghi, JA, Mendoza, TP, Knop, RH, Miller, WM (1998) Ammonia inhibits neural cell adhesion molecules polysialylation in Chinese hamster ovary and small lung cancer cells. *J Cell Physiol* **177**, 248-263

Guidelines und Memoranden:

ICH Harmonised Tripartite Guideline (1997). Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological / Biological Products, Q5D

ICH Harmonised Tripartite Guideline (1999). Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Products: Chemical Substances, Q6A

ICH Harmonised Tripartite Guideline (1999). Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products, Q6B

ICH Harmonised Tripartite Guideline (2000). Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical Ingredients, Q7A

EMA, Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP) (2002). Note for Guidance on the Bovine Serum in the Manufacture of Human Biological Medicinal Products

EMA, Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP) (2002). Note for Guidance on Comparability of Medicinal Products Containing Biotechnology-Derived Proteins as Drug Substance

FDA, Food and Drug Administration (2003). Drug and Biological Product Consolidation, Billing Code 4160-01-S

FDA, Food and Drug Administration (2003). PAT – A Framework for Innovative Pharmaceutical Manufacturing and Quality Assurance

FDA, Food and Drug Administration (1993). Points to Consider in the Characterisation of Cell Lines Used to Produce Biologicals

Patente:

Bryne, T.E., Strickland, T.W., Elliott, S.G.; Amgen Inc. (1990). Erythropoietin Isoforms, **EP 0 428 267 B1**

Treco, D., Heartlein, M.W., Selden, R.F.; Transkaryotic Therapies Inc. (1994). Activating Expression of an Amplifying Endogenous Gene by Homologous Recombination, **WO 94/12650**

Lebenslauf

19. März 1976 geboren in Krefeld

Schule

1982-1986 Grundschule Bellenweg, Krefeld

1986-1995 Fichte Gymnasium, Krefeld

Studium

Oktober 1995 bis März 2000 Studium der Biotechnologie an der TU Braunschweig

August bis Oktober 1998 Studienarbeit: "*Immobilisation of derivatised α -chymotrypsin through co-polymerisation with NIPAAm*" Universität Lund

September 1999 bis März 2000 Diplomarbeit: "*Scale up of a High Density Insect Cell Perfusion Culture using a BioSep Ultrasonic Filter*" Human Genome Sciences Inc., MD, USA

März 2000 Abschluß: Diplom Biotechnologin
Note: sehr gut

Industrie

Juni 2000 bis April 2001 Projektwissenschaftlerin
Labor Dr. Koch-Dr. Merk GmbH

Mai 2001 bis Dezember 2003 Experimentelle Arbeit zur vorliegenden
Dissertation
Aventis Pharma Deutschland GmbH

Juni 2004 bis Juli 2005 Qualitätsmanagerin
Aventis Pharma Deutschland GmbH

Seit Juli 2005 Laborleiterin
Sanofi-Aventis Pharma GmbH